Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Etiologia da pinta rosa da goiaba

Evelyn Yumi Naste Shirado

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

Evelyn Yumi Naste Shirado
Engenheira Agrônoma

Etiologia da pinta rosa da goiaba

Orientador:
Prof. Dr. **MARCEL BELLATO SPÓSITO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Shirado, Evelyn Yumi Naste

Etiologia da pinta rosa da goiaba, / Evelyn Yumi Naste Shirado. - - Piracicaba, 2019.

63 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Psidium guajava* 2. *Cercospora spp*. 3. Filogenia 4. Cercosporina 5. Histopatologia I. Título

DEDICO

"Aos meus pais, Christina Paula Naste Shirado e Sandro Ernei Noboru Shirado, por todo o amor e dedicação que tem por nossa família, aos meus imãos Giovanna Akemy Naste Shirado e Marcel Naste Shirado, pelo companheirismo e amizade".

"À minha avó Yemiko Shirado, exemplo de força e bondade".

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estudar, pelos livramentos e por todas as bênçãos alcançadas.

Ao Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito pela orientação, confiança e compreensão durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Florentino Pascholati e à sua orientada Rafaela Roma, pela gentileza em acompanharem a análise da toxina e por ceder seu laboratório para a condução deste experimento.

Ao Prof. Dr. Nelson S. Massola Júnior, pelo apoio e por ceder seu laboratório para a condução das análises moleculares.

Ao amigo Renan Fernandes Alves por toda a ajuda na condução dos experimentos do início ao fim, sempre disposto a compartilhar conhecimento.

Ao João Paulo Marques e à Bárbara Navarro, pelo auxílio no preparo e desenvolvimento das análises anatômicas.

À Silvia Lourenço, por ser sempre gentil, prestativa e possibilitar um ambiente de trabalho dentro do laboatório de Epidemiologia onde todos pudessem conviver harmoniosamente para que os experimentos fossem realizados da melhor forma possível.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP, pela disponibilidade em desenvolver os trabalhos. Ao Renato, pelo auxílio no manuseio dos equipamentos e desenvolvimento das técnicas em microscopia eletrônica.

Às estagiárias do laboratório de Epidemiologia Bruna Momesso e Kathleen Jade, pela ajuda nas atividades do laboratório e pela amizade.

Aos colegas do departamento de Fitopatologia que se tornaram meus amigos Pamela Dutra, Tainara Menegassi, Jacson Ferreira e Wésler Marcelino, por me apoiarem nos momentos difíceis e fazerem os meus dias em Piracicaba mais felizes.

Aos colegas do laboratório de Epidemiologia, pela convivência agradável e pelos momentos de descontração: Ricardo Feliciano, Luiz Rafael Pinto, Gabriel Chitolina, Ísis Tikami, Rafaela Zázera, Alice Landin, Isabela Primiano, Kelly Pazolini, Antonio Nogueira, Raquel Rosa, Manoel Penachio e Leonardo Mataram.

À Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, pela concessão da bolsa de estudos no final do trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

ELEVO os meus olhos para os montes: de onde me virá o socorro?
O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra.

Salmos 121:1,2

SUMÁRIO

RESUMO **8**
ABSTRACT **9**
1. INTRODUÇÃO **11**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **13**
2.1. A CULTURA DA GOIABEIRA 13
2.2. PINTA ROSA 14
2.3. POSTULADO DE KOCH 15
3. MATERIAL E MÉTODOS **17**
3.1. ORIGEM E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS 17
3.2. ESPORULAÇÃO, CULTURAS MONOSPÓRICAS E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS 17
3.3. TESTE DE PATOGENICIDADE 18
3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CULTURAL 19
3.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* 20
3.6. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO POR PCR E SEQUENCIAMENTO 22
3.7. ANÁLISES FILOGENÉTICAS 23
3.8. DIVERSIDADE INTRAESPECÍFICA 24
3.9. ANÁLISES AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) 24
3.10. HISTOPATOLOGIA 25
3.11. PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA 26
4. RESULTADOS **27**
4.1. TESTE DE PATOGENICIDADE 27
4.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CULTURAL DOS ISOLADOS 28
4.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* 31
4.4. ANÁLISES FILOGENÉTICAS 33
4.5. DIVERSIDADE INTRAESPECÍFICA 42
4.6. ANÁLISES AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) 43
4.7. HISTOPATOLOGIA 45
4.8. PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA 47
5. DISCUSSÃO **49**
6. CONCLUSÕES **55**
REFERÊNCIAS **57**

RESUMO

Etiologia da pinta rosa da goiaba

Produtores dos estados de São Paulo e Paraná relataram a ocorrência de uma nova doença na goiaba. Os sintomas foram pequenas lesões arredondadas de coloração rosa na superfície das goiabas. Devido a esses sintomas o nome pinta rosa foi adotado para se referir a doença relatada. Existem poucos trabalhos publicados na literatura descrevendo sintomas semelhantes aos da pinta rosa. O objetivo desse trabalho foi identificar e descrever o agente causal da pinta rosa da goiaba. Para a realização dos experimentos, 19 isolados monospóricos foram obtidos de goiabas sintomáticas provenientes de regiões produtoras. O teste de patogenicidade foi realizado pela inoculação em goiabas sadias de suspensão de conídios do patógeno isolado de goiabas com pinta rosa. A caracterização morfológica foi realizada pela mensuração de 50 conídios por isolado. A caracterização cultural foi realizada pelo índice de velocidade do crescimento micelial e descrição da coloração da colônia. As análises filogenéticas foram realizadas para os genes ITS, TEF e ACT de forma isolada e concatenada. Construiu-se uma rede de haplótipos para avaliar a diversidade genética intraespecífica dos isolados. O processo de infecção e colonização do patógeno foi avaliado pela observação dos tecidos da goiaba em microscopia eletrônica de varredura e histopatologia. A quantificação da cercosporina para cada isolado foi obtida pela extração da toxina em uma solução de KOH. Os isolados inoculados foram patogênicos a goiaba. Os conídios dos diferentes isolados mostraram-se homogêneos, sendo caracterizados como filiformes, multisseptados, hialinos e com as bases truncadas. A coloração predominante das colônias foi cinza e alguns de cor branca, sendo a maioria com bordas pigmentadas de rosa. Não foi obsevado a presença de esporos nas colônias avaliadas. As características das colônias assim como dos conídios remetem a fungos cercosporioides. Houve diferença significativa entre os 19 isolados quanto a velocidade do crescimento micelial. A análise filogenética das sequências dos genes concatenados comprovou que os isolados pertencem ao gênero *Cercospora* e que esses foram agrupados em quatro haplótipos. Os conídios emitiram em entre 3 e 5 tubos germinativos e a penetração ocorreu através de estômatos. Os testes histoquímicos da região lesionada da goiaba revelaram que houve acúmulo de fenol nos tecidos parenquimáticos e presença de componentes lipídicos na cavidade lisígena. As imagens obtidas sob luz fluorescente, evidenciaram a presença de hifas nos tecidos parenquimáticos abaixo da epiderme e próximas aos estômatos. Para a maioria dos isolados houve produção da toxina cercosporina. Esse é o primeiro relato da pinta rosa em goiabas no Brasil.

Palavras-chave: *Psidium guajava*, *Cercospora spp*., Filogenia, Cercosporina, Histopatologia

ABSTRACT

Aetiology of pink spot on guava

Growers from the states of São Paulo and Paraná reported the occurrence of a new disease in guava. The symptoms were small round pink lesions on the surface of guava fruits. Therefore, the name pink spot was adopted to refer to this disease. Only a few studies in the literature describe symptoms like those caused by the pink spot. The objective of this study was to identify and describe the causal agent of pink spot on guava. The experiments consisted of collecting 19 single spore isolates from healthy guava fruits with symptoms coming from the growing regions where the disease was reported. The pathogenicity test was performed by inoculating a conidial suspension of the pathogen isolated from guava fruits with pink spot. Morphological characterization was performed through the measurement of 50 conidia per isolate. Cultural characterization was performed by mycelial growth rate and colony color description. Phylogenetic analyzes were performed for ITS, TEF, and ACT genes, in isolation and concatenated. A haplotype network was constructed to evaluate the intraspecific genetic diversity of the isolates. The process of infection and colonization of the pathogen was evaluated by observing guava tissues under scanning electron microscopy and histopathology. The quantification of cercosporin for each isolate was obtained through toxin extraction in a potassium hydroxide solution. These isolates were pathogenic to guava (fruits). The conidia of the different isolates were homogeneous; they were characterized as filiform, multiseptate, hyaline, and with truncated bases. The colonies were predominant gray color and a few white, and most colonies showed edges with pink pigmented. No spores were observed in the colonies evaluated. The characteristics of colonies as well as conidia refer to cercosporioid fungi. The 19 isolated showed significant difference regarding mycelial growth velocity. Phylogenetic analysis of the sequences of the concatenated gene showed that all isolates belong to the genus Cercospora and the isolates grouped into into four haplotypes. Conidia emitted an average of 3 to 5 germ tubes, and penetration occurred through the stomata. Histochemical tests of the injured guava region revealed phenol accumulation in the parenchymal tissues, and the presence of lipidic compounds in the lysine cavity. The images obtained under fluorescent light showed the presence of hyphae in the parenchyma tissues, below the epidermis, and near the stomata. Most isolates had production of cercosporin toxin. This is the first report of pink spot on Guava in Brazil.

Keywords: *Psidium guajava*; *Cercospora spp*.; Phylogeny; Cercosporin; Histopathology

1. INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava L.*) é uma planta cultivada em diversos países, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Entre os países produtores de goiaba, destaca-se o Brasil com uma produção de 424.305 toneladas em uma área de 17.603 hectares (IBGE, 2017). Os estados brasileiros com as maiores produções de goiaba são Pernambuco com 34,15% e São Paulo com 33,86% da produção brasileira (FNP, 2018). No mercado *in natura* há uma preferência no consumos de goiabas de polpa vermelha, com uma comercialização na Ceagesp de 11.190 toneladas, enquanto que as goiabas de polpa branca a comercialização é menor, na ordem de 1.016 toneladas (FNP, 2018).

Dentre os fatores que podem diminuir a produtividade no cultivo de goiabas, estão as doenças. Entre as principais doenças da goiabeira estão a bacteriose (*Erwinia psidii*), a ferrugem (*Austopuccinia psidii*), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporiodes* e *C. acutatum*), a podridão parda (*Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*) e a pinta preta (*Guignardia psidii*) (PICCININ et al., 2016). Contudo, produtores de goiaba dos estados de São Paulo e Paraná relataram, em meados de 2015/2016, sintomas diferentes dos causados por essas importantes doenças da cultura da goiabeira. Trata-se de pequenas lesões arredondadas de coloração rosa a avermelhada na superfície dos frutos, a qual tornou-se conhecida, entre os produtores, como pinta rosa. Esses sintomas foram observados nas variedades Paluma, Pedro Sato e Tailandesa. Os sintomas afetam principalmente a comercialização de frutas destinadas à mesa, pela perda de qualidade, apesar de aparentemente não afetar o fruto internamente. Porém, em casos mais severos da doença pode ocorrer o coalescimento das lesões e por sua vez o aceleramento da maturação nas goiabas, culminando em apodrecimento precoce e tornando-as inviáveis para o consumo. Por ser uma doença nova, ainda não existem relatos da quantificação de perdas na produção e de danos econômicos por ela provocados.

No mundo existem dois relatos descrevemdo sintomas semelhantes aos da pinta rosa em goiabas que são observados no Brasil. Um relato na Venezuela (FLORES et al., 2009) e outro na África do Sul (JACOBS et al., 2014). Em cada desses artigos publicados atribuiu-se à doença um agente causal distinto. Na Venezuela, os autores atribuíram à doença ao fungo agente causal *Phyllosticta psidiicola* e na África do Sul ao fungo agente causal pertencente ao gênero

Mycosphaerella. Entretanto, em nenhum dos dois trabalhos publicados foi realizado teste de patogenicidade, e portanto não foi realizado o postulado de Koch, para a comprovação efetiva do agente causal da doença.

A identificação do agente causal de doenças avaliadas somente pela morfologia dos fungos é questionável devido à semelhança morfológica entre várias espécies, assim como os tipos de colônias por elas formadas, isto posto, algumas espécies requerem análises filogenéticas para uma correta identificação (GROENEWALD et al 2013).

No Brasil, não há registro de trabalhos relacionados à pinta rosa, evidenciando-se a relevância de seu estudo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi elucidar a etiologia da pinta rosa da goiaba observada em pomares do estado de São Paulo e Paraná.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da goiabeira

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) tem sua origem na América do Sul, contudo atualmente é encontrada em diversas partes do mundo, em especial nas regiões tropicais e subtropicais. Essa espécie pertence à família Myrtaceae, constituída de 70 gêneros e mais de 2800 espécies (COSTA; PACOVA, 2003; PEREIRA, 1995) das quais incluem-se espécies de eucalipto, e frutíferas como o araçazeiro, a jabuticabeira e a pitangueira.

Essa planta é perene e tem o porte pequeno a médio, variando de 3 a 6 m de altura, porém pode chegar a 9 m quando conduzida sem poda (COSTA; PACOVA, 2003). A casca dos caules adultos destaca-se em lâminas finas com facilidade, essa característica é típica da maioria das mirtáceas, já os caules novos são lisos (MANICA et al., 2000). As flores são hermafroditas e de coloração branca, o fruto é do tipo baga globosa e varia com relação ao tamanho, forma e coloração da polpa, de acordo com a variedade (MANICA et al., 2000). Para plantios comerciais, o principal meio de propagação é o uso de mudas propagadas vegetativamente por enxertia ou estaquia, as quais iniciam a floração com 7 a 8 meses de idade, após o transplantio para o local definitivo (COSTA; PACOVA, 2003).

Do ponto de vista nutricional, a goiaba destaca-se por ser um fruta rica em potássio, vitamina C, folatos, carotenoides e fibras, além disso, apresenta baixos teores de gordura, sendo uma excelente alternativa para uma alimentação saudável, quando consumida *in natura* (AMAYA; FARFAN, 2009).

O Brasil está entre os maiores países produtores dessa fruta, com uma produção de 424.305 toneladas em uma área de 17.603 hectares (IBGE, 2017). Os estados brasileiros com as maiores produções são Pernambuco com 34,15% e São Paulo com 33,86% da produção brasileira de goiabas (FNP, 2018).

As variedades de goiaba mais comercializadas no mercado atacadistas da CEAGESP-SP são as do grupo de polpa branca (‘Kumagai’, ‘Chinesa’) e de polpa vermelha (‘Pedro Sato’, ‘Paluma’, ‘Sassaoka’, ‘Chinesa’, ‘Cascuda’ e ‘Pariquera-Açu’) (WATANABE, 2009).

Há uma preferência de consumo *in natura* de goiabas de polpa vermelha, com uma comercialização na CEAGESP-SP de 11.190 toneladas, enquanto que as

goiabas de polpa branca foram comercializadas na ordem de 1.016 toneladas (FNP, 2018).

2.2. Pinta rosa

Em meados de 2015/2016 produtores de goiaba de diferentes regiões, localizadas nos municípios de Elias Fausto e Piracicaba no Estado de São Paulo e no município de Carlópolis no Estado do Paraná, relataram pequenas lesões arredondadas de coloração rosa a avermelhada na superfície dos frutos das variedades Paluma, Pedro Sato e Tailandesa. Nas folhas também foram relatados sintomas semelhantes. Devido aos sintomas descritos a doença ficou conhecida como pinta rosa.

Esses sintomas afetam principalmente a comercialização de frutas destinadas ao consumo *in natura*, ocorrendo perda de qualidade, apesar de aparentemente não afetar o fruto internamente. Porém, em casos mais severos da doença pode ocorrer o coalescimento das lesões e por sua vez o aceleramento da maturação nas goiabas, culminando em apodrecimento precoce e tornando-as inviáveis para o consumo. Por ser uma doença nova, ainda não existem relatos da quantificação de perdas na produção e de danos econômicos provocados pela doença.

Diferente das doenças já conhecidas e de grande relevância por causarem sérios danos na produção de goiabas, como a antracnose e a pinta preta, que apresentam sintomas bem característicos, os sintomas que caracterizam a pinta rosa nas goiabas são atípicos, e o seu relato na literatura é escasso.

No mundo existem dois relatos descrevemdo sintomas semelhantes aos da pinta rosa em goiabas observados no Brasil. Um relato na Venezuela (FLORES et al., 2009) e outro na África do Sul (JACOBS et al., 2014). Em cada artigo atribuiu-se à doença um agente causal distinto. Na Venezuela, os autores atribuíram à doença ao fungo agente causal *Phyllosticta psidiicola*, baseado apenas na morfologia dos isolados e na África do Sul ao fungo agente causal pertencente ao gênero *Mycosphaerella*, baseado em análises filogenéticas. Entretanto, em nenhum dos dois trabalhos publicados foi realizado teste de patogenicidade, e por consequência o postulado de Koch, para a comprovação do agente causal da doença.

2.3. Postulado de Koch

Uma sequência de procedimentos, denominada de Postulado de Koch, deve ser realizada para estabelecer a relação causal entre o microrganismo e a doença. Este postulado, descrito pelo médico Robert Koch (1843–1910) em 1887, é composto por quatro etapas, onde o primeiro passo é a confirmação de que o sintoma deve estar associado ao suspeito patógeno, em seguida deve-se realizar o isolamento em uma cultura pura do microrganismo que está causando a doença no hospedeiro, seguido da inoculação desse microrganismo em um hospedeiro sadio e após a observação dos sintomas visíveis da doença, realizar o reisolamento do microrganismo em uma cultura pura, para a comprovação de que esse patógeno apresenta as mesmas características observadas do isolado inoculado inicialmente (AGRIOS, 2005).

Portanto, esses procedimentos se baseiam na comparação entre os sintomas no hospedeiro causados pelo patógeno e a morfologia dos esporos do isolado inoculado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e na área experimental do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, localizada no município de Piracicaba, SP.

3.1. Origem e obtenção dos isolados

Para a condução dos experimentos foram utilizados isolados, obtidos de frutos com sintomas característicos da pinta rosa. Os frutos foram coletados em diferentes regiões produtoras de goiaba, localizadas nos municípios de Elias Fausto e Piracicaba no Estado de São Paulo e no município de Carlópolis no Estado do Paraná (Tabela 1). O isolamento do patógeno foi feito a partir de frutos sintomáticos, onde foram retirados, em câmara de fluxo laminar, fragmentos da casca de goiaba contendo tecidos sadios com tecidos lesionados. Os fragmentos foram desinfestados com solução de etanol a 70% (v/v), por 30 s, hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v), por 1 min, e lavagem em água destilada esterilizada, e foram transferidos para placas de Petri contendo meio ágar-água. Em cada placa de Petri foram colocados, equidistantes no meio de cultura, quatro fragmentos de tecidos da casca de goiaba. As placas foram devidamente fechadas e mantidas em câmaras de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12h. Após o crescimento micelial, com o auxílio de uma agulha flambada, porções de micélio do fungo foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram mantidas em câmaras de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12h.

No total, foram obtidos 19 isolados em dois anos de coleta nos três diferentes locais de origem (Tabela 1). A preservação dos isolados foi realizada a partir do crescimento micelial das culturas em meio ágar-água, onde discos de micélio foram repicados para placas contendo meio BDA juntamente com fragmentos de 1 cm^2 de papéis de filtro esterilizados distribuídos ao redor do disco de micélio. Após o crescimento micelial sobre os papéis, estes foram retirados da placa e armazenados em envelopes e transferidos para caixas de Gerbox contendo sílica-gel esterilizada e mantidos a -20 °C para a preservação do micélio.

Tabela 1. Identificação do isolado, local de origem e ano de coleta dos frutos de goiabeiras com sintomas de pinta rosa.

Isolados	Local de origem	Ano de coleta
PS8	Elias Fausto/SP	2015
PS23	Elias Fausto/SP	2015
PS9	Elias Fausto/SP	2015
PS10	Elias Fausto/SP	2015
PS11	Elias Fausto/SP	2015
PS12	Elias Fausto/SP	2015
PS13	Elias Fausto/SP	2015
PS14	Elias Fausto/SP	2015
PS1	Carlópolis/PR	2015
PS2	Carlópolis/PR	2015
PS3	Carlópolis/PR	2015
PS4	Carlópolis/PR	2015
PS5	Carlópolis/PR	2015
PS6	Carlópolis/PR	2015
PS7	Carlópolis/PR	2015
PS24	Carlópolis/PR	2015
PS19	Piracicaba/SP	2017
PS17	Piracicaba/SP	2017
PS21	Piracicaba/SP	2017

3.2. Esporulação, culturas monospóricas e preservação dos isolados

Para a esporulação dos isolados, seguiu-se a metodologia adaptada por Silva et al. (2016). Frascos devidamente vedados contendo 6 mL de água destilada e 4 mL de suco de tomate V8 foram autoclavados, em seguida, 3 discos de micélio do fungo de cada isolado foram colocados em frascos separados de acordo com o isolado. Os frascos foram agitados a 200 rotações por minuto, durante 5 dias consecutivos, a fim de induzir a esporulação. Após este período, o conteúdo dos frascos foi vertido em placas de Petri contendo ágar-água, as quais permaneceram abertas em fluxo laminar por 3 dias ou até que o meio de cultura estivesse desidratado, sob luz contínua e temperatura ambiente. Após este período, foram

adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri, com a finalidade de obtenção da suspensão de conídios. Dessa suspensão foi coletado 1 mL e depositado em placas de Petri contendo ágar-água, as quais foram incubadas a 25 °C no escuro durante 12 horas. Decorrido este intervalo, foram observados os conídios germinados.

Os isolados monospóricos foram obtidos com o auxílio de uma agulha acoplada ao microscópio óptico, a qual realiza um movimento de 360º, e dessa forma foram cortados pequenos círculos do meio ágar-água contornando um conídio germinado. Cada círculo cortado contendo um conídio foi transferido para uma placa de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

A preservação dos isolados monospóricos foi realizada a partir do crescimento micelial das culturas monospóricas, onde discos de micélio foram repicados para placas contendo meio BDA juntamente com fragmentos de 1 cm^2 de papéis de filtro esterilizados distribuídos ao redor do disco de micélio. Após o crescimento micelial sobre os papéis, estes foram retirados da placa e armazenados em envelopes e transferidos para caixas de Gerbox contendo sílica-gel esterilizada e mantidos a -20 °C para a preservação do micélio.

3.3. Teste de patogenicidade

Para a realização do teste de patogenicidade da pinta rosa da goiaba, foram realizados dois ensaios, em locais e épocas do ano diferentes. O primeiro foi conduzido no mês de dezembro de 2017, em casa de vegetação, onde foram utilizadas 14 goiabeiras da variedade Paluma, com quatro anos de idade, cultivadas em vasos de 20 litros. As plantas foram mantidas em casa de vegetação no Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, sendo completamente podadas antes da inoculação. Após a brotação e formação dos frutos foi realizada a inoculação quando as goiabas apresentaram diâmetro médio de 2,5 cm. Dez goiabeiras tiveram seus frutos inoculados, com a aplicação de suspensão de conídios do isolado monospórico PS24, na concentração de 10^4 esporos mL^{-1}, ajustada com o auxílio da câmara de Neubauer. Quatro goiabeiras serviram de controle, sendo apenas borrifadas com água. As plantas após serem inoculadas

foram cobertas por plástico, a fim de formar uma câmara úmida e favorecer o processo de infecção. O plástico foi retirado após 24h da inoculação.

O segundo ensaio foi conduzido no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, no mês de abril de 2019, onde duas goiabeiras das variedades Paluma e Tailandesa, com seis anos de idade, tiveram seus frutos inoculados com os isolados PS1, PS9, PS24 e PS17, representando os haplótipos obtidos nas análises moleculares H1, H2, H3 e H4, respectivamente. A inoculação foi realizada quando as goiabas apresentaram diâmetro médio de 2,5 cm e os procedimentos de inoculação foram os mesmos do primeiro ensaio.

As goiabas que apresentaram sintomas característicos da pinta rosa foram encaminhadas ao laboratório de Fitopatologia, onde foi realizado o reisolamento do patógeno, com o propósito de observar se o mesmo fungo inicialmente inoculado corresponderia ao patógeno reisolado das goiabas sintomáticas, por meio da comparação das características morfológicas do esporo e do micélio, comprovando-se a patogenicidade dos isolados inoculados e concluindo o Postulado de Koch. Realizou-se, também, o sequenciamento dos isolados utilizados na inoculação e os reisolados onde foram comparados utilizando técnicas moleculares.

3.4. Caracterização morfológica e cultural

Para a caracterização morfológica dos conídios de cada isolado monospórico, uma alíquota da suspensão de conídio, obtida por meio da metodologia proposta por Silva et al. (2016), foi depositada sobre uma lâmina de microscopia óptica, onde foram observadas as características dos conídios como, o tamanho, a forma, a cor e a presença de septos. Foram avaliados 50 conídios de cada um dos 19 isolados monospóricos utilizados no estudo. O comprimento e a largura dos conídios foram mensurados com o auxílio de uma câmara fotográfica Axiocam 503 color (Carl Zeiss) acoplada em um microscópio Axio Lab.A1 (Carl Zeiss) em aumento 100x. A partir dos resultados foi calculado a média, a amplitude e o desvio padrão do comprimento, da largura e da relação comprimento e largura.

Para a caracterização cultural de cada um dos 19 isolados monospóricos, discos de micélio, de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram retirados da zona periférica das colônias dos isolados após 7 dias de cultivo e foram transferidos para placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, contendo meio BDA. As

placas de Petri foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperiodo de 12h, durante 7 dias. Após esse período foram avaliados o tipo de micélio e a forma e coloração da colônia.

3.5. Avaliação do crescimento micelial *in vitro*

Para a análise do crescimento micelial, discos de micélio de 50 mm de diâmetro de todos os isolados foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA, as quais foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ºC e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (4 placas) para cada isolado. Foram realizados dois experimentos. O diâmetro médio das colônias foi obtido a cada 48 horas a partir de duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia, com o auxílio de um paquímetro digital. No total foram realizadas sete medições em um intervalo de 15 dias. Após esse período obteve-se o diâmetro final (D_F) da colônia e calculou-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), empregando a equação, adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\Sigma (D - Da)}{N}$$

Em que, IVCM é o índice de velocidade de crescimento micelial; D é o diâmetro médio do dia de avaliação da colônia (mm); Da, o diâmetro médio da colônia no dia anterior da avaliação (mm); e N, o número de dias após a inoculação.

Este experimento foi repetido duas vezes. Considerando-se que os dados de IVCM e D_F entre os experimentos foram significativos pelo teste-t ($p>0,05$), estes foram analisados separadamente. A homogeneidade das variâncias foi aferida pelos testes de Bartlett e a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. No experimento 1, todas as pressuposições foram atendidas, contudo, no experimento 2, as variâncias dos dados não foram consideradas homogêneas sendo necessária a transformação das variáveis originais de acordo com a potência ótima sugerida pelo parâmetro de transformação de Box-Cox. Os resultados foram então submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). Todas as análises foram efetuadas utilizando-se o software R versão 3.4.3 (R CORE TEAM, 2019).

3.6. Extração e purificação de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

Para a realização da extração de DNA dos isolados em estudo foi retirada, com o auxílio de um bisturi esterilizado, uma porção de micélio (0,5 cm²) de cada um dos 19 isolados monospóricos crescidos em placas de Petri contendo BDA, as quais estavam mantidas a 25 ºC e fotoperiodo de 12h. Para as etapas de extração de DNA e purificação, utilizou-se o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Três regiões do DNA foram amplificadas, sendo essas as regiões internal transcribed spacer (ITS), elongation factor 1-α (TEF) e actina (ACT), com o uso dos pares de primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), elongation-1-F e elongation-1-R (HYUN et al., 2009) e ACT-512F e ACT-783R (CARBONE; KOHN, 1999), respectivamente.

O conteúdo da reação da PCR totalizou 25 µL, compostos por 2 µL de DNA (25 ng μL^{-1}), 8.5 µL de Nuclease Free Water, 1 µL de cada primer (10 µM) e 12,5 µL de GoTaq Colorless Master Mix 2x (Promega). As reações da PCR foram realizadas em termociclador (SuperCycler Trinity, Kyratec or TC-512, Techne).

O ciclo para a PCR da região ITS consistiu na desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelando a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 5 min. Para a região TEF, a desnaturação inicial foi de 94 ºC por 2 min, seguida de 40 ciclos de amplificação (94 ºC por 10s, 53 ºC por 30s e 72 ºC por 1 min) e uma extensão final a 72 ºC por 1 min. Para a região ACT, a desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min, seguido por 40 ciclos de amplificação (94 ºC por 30s, 52 ºC por 30s e 72 ºC por 30s) e uma extensão final a 72 ºC por 7 min. Os fragmentos de DNA amplificados, foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo (1 µg L-1), em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato + 1 mM EDTA), sendo visualizado sob luz ultravioleta. Utilizou-se como marcador de peso molecular, o marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA). A purificação foi realizada usando o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos do sequenciamento da PCR foram realizados usando o 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC, Piracicaba, Brasil).

3.7. Análises filogenéticas

As sequências direta e reversa obtidas de cada um dos 19 isolados mosopóricos foram editadas usando o programa Sequencher 5.4.1 (Gene Codes Corporation, 2016) para obtenção do “contig” (Codon Code Corporation). Essas sequências, foram analisadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999), e comparadas com as sequências existentes no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) do National Center for Biotechnological Information (NCBI), utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Por meio do algoritmo ClustalW no BioEdit, as sequências que apresentaram os maiores “escores” foram selecionadas e alinhadas juntamente com sequências obtidas neste trabalho. Foram incluídas nas análises, sequências de espécies do gênero *Cercospora* analisadas no trabalho de Groenewald et al. (2013) e disponíveis no GenBank (Tabela 4). O software Mesquite foi utilizado para concatenar os múltiplos alinhamentos (MADDISON; MADDISON, 2011).

A fim de estimar o modelo de substituição de nucleotídeos para cada locus, foi utilizado o programa MrModeltest v.2.3 (NYLANDER, 2004), baseado no AIC (critério de informação Akaike). O método de inferência Bayesiana foi utilizado para reconstrução filogenética baseado no alinhamento multilocus, usando o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo), para gerar árvores filogenéticas com probabilidade *a posteriori*. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente com $1x10^7$ gerações. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram editadas pelo programa TreeView (PAGE, 1996). A inferência Bayesiana foi realizada duas vezes no programa MrBayers v.3.1.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), para cada análise filogenética. Todas as sequencias geradas neste estudo foram depositadas no GenBank. Foram construídas quatro árvores filogenéticas, sendo uma para cada gene (ITS, TEF e ACT) e outra concatenando todos os genes.

3.8. Diversidade intraespecífica

A caracterização da diversidade genética intraespecífica das sequências dos 19 isolados monospóricos obtidos neste trabalho foi realizada por meio da determinação dos haplótipos de cada locus e de uma combinação de locus (ITS, TEF e ACT) usando o programa DNASP v. 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para o conhecimento da relação filogenética entre os isolados analisados, construiu-se uma rede de haplótipos, com o auxílio dos programas PopArt V1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015) e TCS v. 1.21:2 (CLEMENT et al., 2000). Essa análise é baseada em uma matriz de distância genética entre todos os haplótipos, que os conecta par a par, até todos estarem ligados à rede. Os “gaps” ou “indels” foram codificados como dados perdidos e dessa forma não se diferenciaram dos haplótipos. Foi utilizado o método da parcimônia estatística, com confiabilidade de 95% (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992).

3.9. Análises ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Uma alíquota de 70 µL da suspensão de conídios do isolado PS24 na concentração de 10^3 esporos mL^{-1} foi depositada sob a superfície de goiabas, e essas foram mantidas sob o período de molhamento de 24 h. Após esse período, os tecidos onde a alíquota foi depositada, foram cortados em fragmentos de 0,5 cm^2, fixados com o fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e desidratados em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%). Na sequência, foi feita a inclusão imediata na câmara de secagem ao ponto crítico de CO_2 (HORRIDGE; TAMM, 1969), montada sobre fitas de carbono dupla face, e essas sobre suportes de alumínio. As amostras foram cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm no equipamento Balzers modelo SCD 050. As observações foram feitas com o microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo LEO 435VP, operado a 20kv com as escalas impressas diretamente nas eletromicrografias. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP. Esse mesmo procedimento foi realizado para a visualização das lesões de goiabas sintomáticas.

3.10. Histopatologia

Goiabas assintomáticas e goiabas que apresentavam os sintomas de pinta rosa foram coletadas, seccionadas na região da lesão e sadio, e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), modificado com tampão fosfato pH 7,2, por 24 horas. Durante a fixação as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Em seguida as amostras foram desidratadas por meio de dez lavagens por 15 minutos em cada série etanólica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Então, foram infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany), para a formação de blocos.

Os blocos foram seccionados a 5-7 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045, e as secções foram montadas em lâminas de vidro. Em seguida, as lâminas foram depositadas sobre uma placa aquecedora a 40ºC para a secagem e fixação das secções na lâmina. As secções foram coradas com Azul de Toluidina, para as análises histológicas usuais (SAKAI, 1973); com Sudan IV, para substâncias lipofílicas (PEARSE, 1968); com Vermelho de Rutênio, para a detecção de compostos de natureza péctica (CHAMBERLAIN, 1932); e com Cloreto Férrico, para evidenciar compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940). Depois de coradas, as lâminas foram montadas em resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). As lâminas obtidas foram observadas com o auxílio do microscópio de luz Leica DMLD e as imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio.

Outras secções foram coradas com WGA Alexafluor 488 por 30 minutos, para a detecção de quitina, onde os tecidos fluorescem em verde, e foi visualizado com filtro 5 L (excitação entre 460 e 500 nm e emissão entre 515 e 485 nm). Para a detecção de celulose secções foram coradas com Calcofluor White (TRESE; LOSCHKE, 1990) por 1 minuto, onde os tecidos fluorescem em azul, e foi visualizado com filtro DAP (excitação entre 325 a 375 nm e emissão 515 e 485 nm).

As imagens obtidas por meio das colorações fluorescentes foram analisadas ao microscópio Leica DM 5500 e capturadas utilizando a câmera Leica DFC365 FX e submetidas a deconvolução no software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF).

3.11. Produção de cercosporina

Para a avaliação da produção de cercosporina, os 19 isolados monospóricos preservados em papéis de filtro com diâmetro de 0,5 cm foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA a 25°C e fotoperíodo de 12h. A extração da cercosporina foi realizada após 10 dias de cultivo da colônia. Para isso, foram removidos três discos de micélio contendo BDA (4 mm de diâmetro) para cada isolado, os quais foram imersos em 8 mL de KOH 5N por 4 h a 25°C no escuro (JENNS et al., 1989). Realizou-se a leitura da absorbância dos extratos em espectrofotômetro. Os isolados cujos extratos apresentaram coloração verde e picos de absorção a 480, 595 e 640 nm, foram considerados produtores de cercosporina (BALIS; PAYNE, 1971). A concentração da toxina no extrato foi estimada pelo uso do coeficiente de extinção molar de 23300 para leituras de A480 nm (JENNS et al., 1989). A concentração de cercosporina por isolado foi calculada pela média dos três discos de micélio. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições no tempo, sendo uma placa considerada uma unidade experimental. O experimento foi realizado duas vezes.

Os dados de concentração de cercosporina entre os experimentos foram comparados pelo teste-t ($p<0.05$), e analisados conjuntamente quanto a sua homogeneidade de variância pelos testes de Bartlett e normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmo-gorov-Smirnov. Atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando-se o software R versão 3.4.3 (R CORE TEAM, 2019).

4. RESULTADOS

4.1. Teste de patogenicidade

No primeiro ensaio, os frutos da variedade Paluma foram inoculados com o isolado PS24 com diâmetro médio de 2,5 cm e apresentaram sintomas após 53 dias de incubação, quando os frutos apresentavam diâmetro médio de 5,5 cm. Os sintomas observados foram pequenas lesões arredondadas de coloração rosa, característico da doença pinta rosa em estudo (Figura 1). Os frutos com sintomas da doença foram encaminhados ao Laborarório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP, onde realizou-se o reisolamento do patógeno em meio BDA. Após o crescimento da colônia, observou-se a morfologia dos conídios e do micélio produzido e comparou-se com o isolado utilizado para a inoculação dos frutos, comprovando-se dessa forma a patogenicidade do isolado inoculado inicialmente. Foi realizada também a comparação molecular entre o isolado utilizado para a inoculação e o reisolado dos frutos sintomáticos confirmando assim a sua origem, e concluindo o Postulado de Koch. Frutos de plantas controle não apresentaram sintomas da doença. Nesse estudo comprovou-se que a pinta rosa é uma doença biótica causada por fungo.

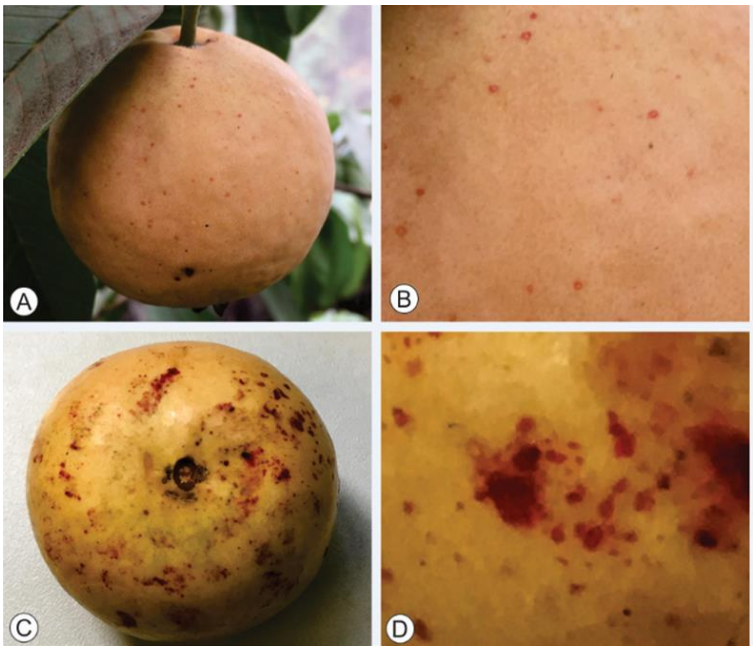

Figura 1. Sintomas da doença pinta rosa da goiaba em goiabas da variedade Paluma aos 53 dias após a inoculação do isolado PS24 (A-D). Visão geral das goiabas inoculadas apresentando lesões (A e C) e detalhe das lesões (B e D).

No segundo ensaio, os frutos com diâmetro médio de 2,5 cm das variedade Paluma e Tailandesa foram inoculados com os isolados PS1, PS9, PS24 e PS17, representando os haplótipos obtidos nas análises moleculares H1, H2, H3 e H4, respectivamente. Apenas os isolados PS24 (H3) em goiaba 'Paluma' e PS17 (H4) em goiaba 'Tailandesa' apresentaram sintomas após 90 dias de incubação, quando os frutos apresentavam diâmetro médio superiores a 5,5 cm. Os sintomas observados foram pequenas lesões arredondadas de coloração rosa, característico da doença pinta rosa em estudo (Figura 2). Frutos de plantas controle não apresentaram sintomas da doença. Os frutos com sintomas da doença foram encaminhados ao Laborarório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP, onde realizou-se o reisolamento do fungo em meio BDA. Após o crescimento da colônia, observou-se a morfologia dos conídios e do micélio produzido e comparou-se com o isolado utilizado para a inoculação dos frutos, comprovando a patogenicidade do isolado inoculado inicialmente.

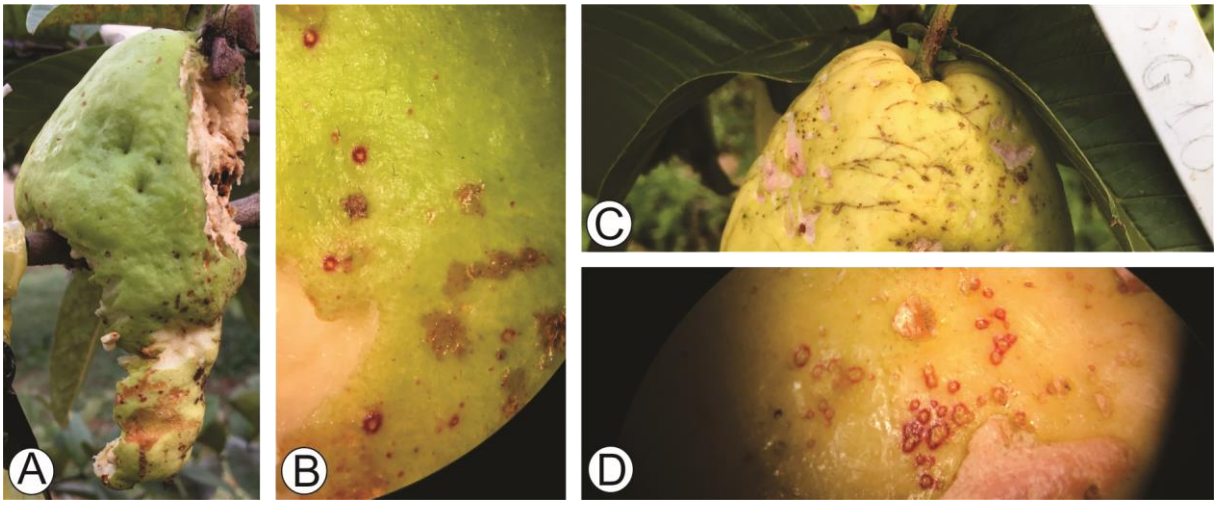

Figura 2. Sintomas da doença pinta rosa da goiaba aos 90 dias após a inoculação. Visão geral da goiaba da variedade Tailandesa apresentando lesões de pinta rosa, inoculada com o isolado PS17 (A) e detalhes das lesões (B). Visão geral da goiaba da variedade Paluma apresentando lesões de pinta rosa, inoculada com o isolado PS24 (C) e detalhes das lesões (D).

4.2. Caracterização morfológica e cultural dos isolados

As colônias obtidas nesse estudo, após 7 dias de crescimento micelial em meio BDA, sob temperatura de 25 ºC e fotoperíodo de 12 horas, variaram em relação a cor e se dividiram em três grupos com características distintas. Dos 19

isolados avaliados, 14 colônias apresentaram micélio cinzento (variando entre cinza escuro e claro) e com borda de cor rosa (Figura 2A-E, H-O e R); três colônias apresentaram coloração branca com bordas rosas (Figura 2P, Q e S), e duas colônias com micélio branco (Figura 2F e G). Não foi obsevado a presença de esporos nas colônias avaliadas.

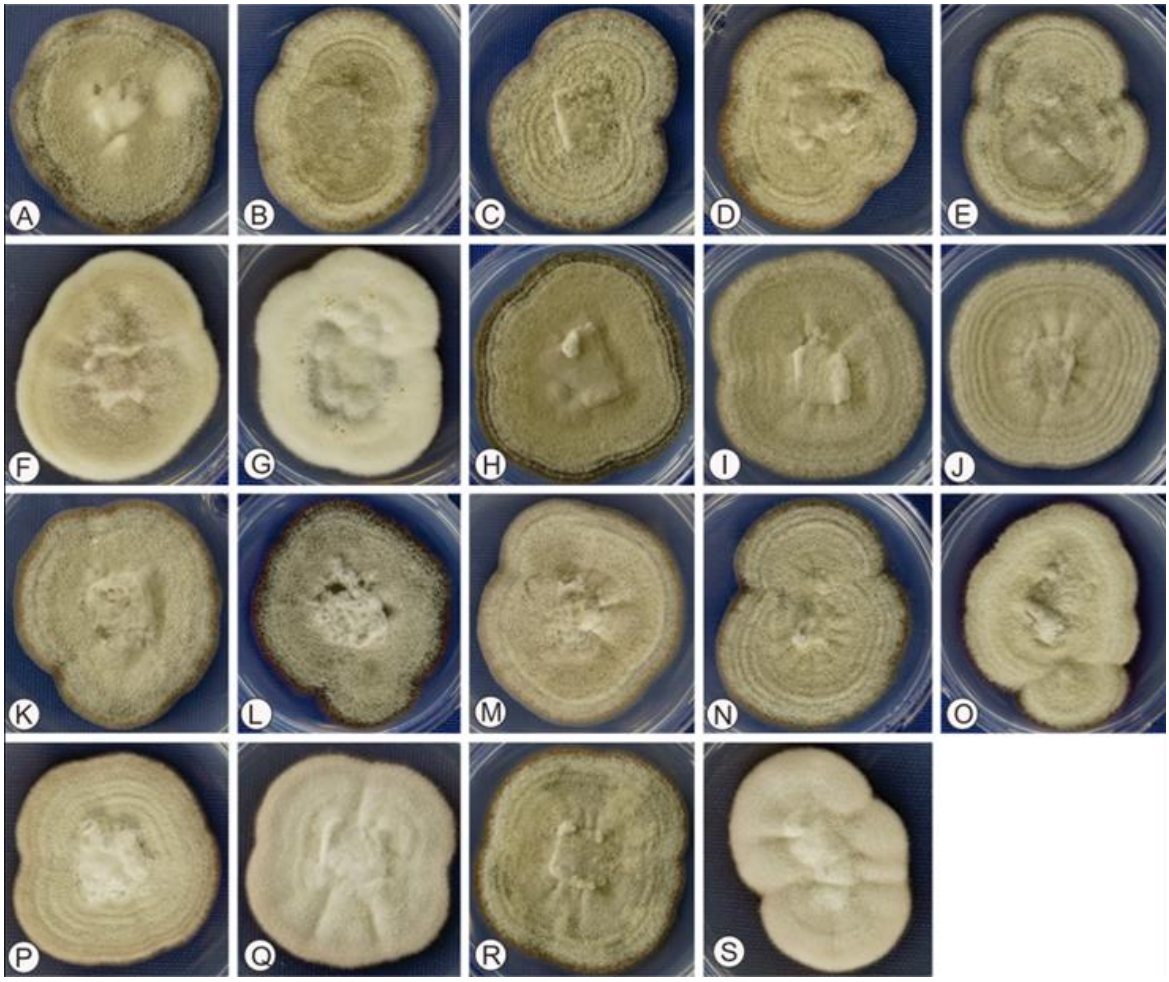

Figura 3. Aspectos das colônias dos isolados da pinta rosa, após sete dias de cultivo em meio BDA, sob temperatura de 25 ºC e fotoperíodo de 12 horas. A. PS1, B. PS2, C. PS3, D. PS4, E. PS5, F. PS6, G. PS7, H. PS8, I. PS9, J. PS10, K. PS11, L. PS12, M. PS13, N. PS14, O. PS17, P. PS19, Q. PS21, R. PS23 e S. PS24.

Os conídios foram considerados homogênios entre os isolados, sendo caracterizados como filiformes, multisseptados, hialinos e com as bases truncadas (Figura 4D-G). A média do comprimento, da largura e da relação comprimento e largura dos 50 esporos avaliados de cada umd dos 19 isolados variou entre 59 e 121,3 µm de comprimento, 2,4 e 4,3 µm de largura e 15,7 e 42,4 µm da relação

comprimento e largura (Tabela 2). Os conidióforos são eretos, septados, fasciculados e de coloração marrom pálido (Figura 4C).

O isolado PS24, utilizado no teste de patogenicidade apresentou micélio cinzento, colônia de coloração branca e com borda rosa (Figura 3S). Os conídios apresentaram comprimento médio de 82,8 µm, largura média de 2,4 µm, e relação comprimento e largura média de 34,3 µm (Tabela 2) e se caracterizaram como filiformes, multisseptados, hialinos e com as bases truncadas (Figura 4F).

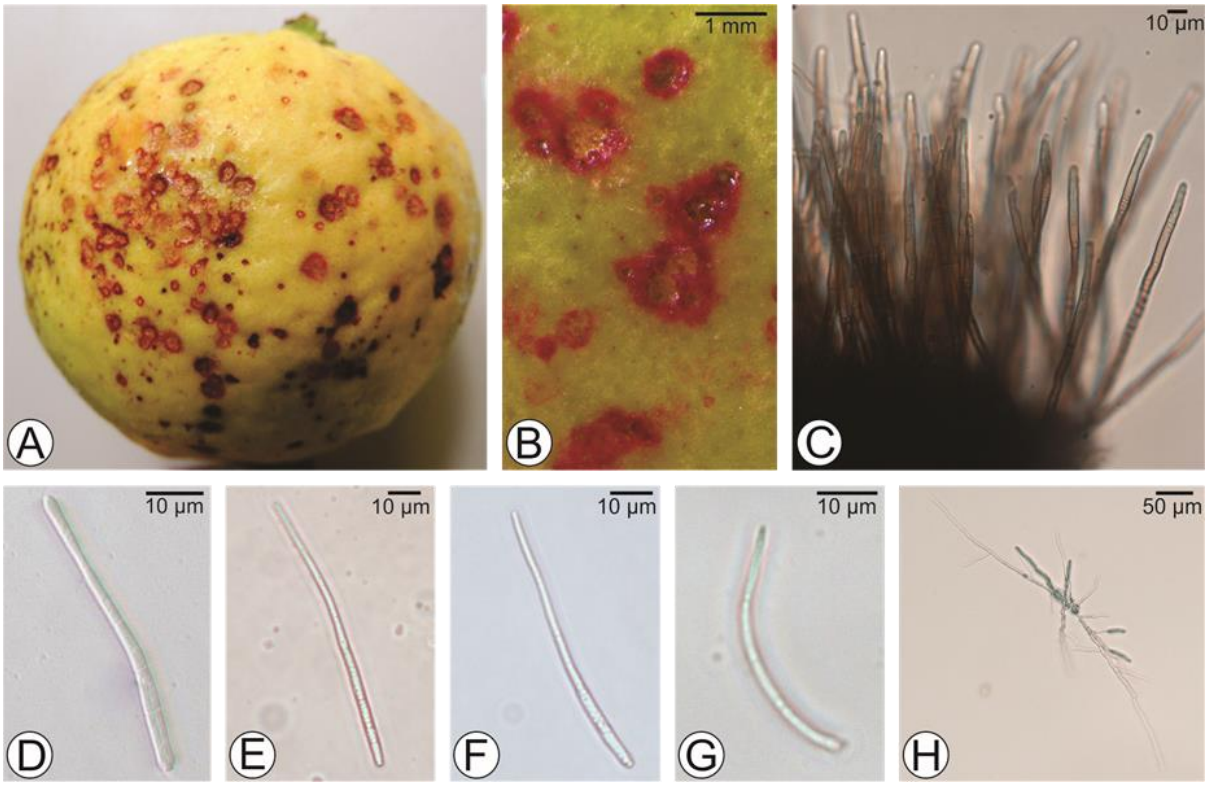

Figura 4. Goiaba ‘Paluma’ com sintoma da pinta rosa (A). Detalhe da lesão da pinta rosa (B). Conidióforo formado (C). Conídios dos haplótipos H1, H2, H3 e H4, respectivamente (D-G). Conídio germinado após 24h (H).

Tabela 2. Dimensões dos conídios dos 19 isolados monospóricos obtidos de lesões de pinta rosa, obtidos entre 2015 e 2017 de goiabas coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo e Paraná. As médias representam valores de 50 conídios de cada isolado

	Comprimento (µm)		Largura (µm)		Comprimento/Largura (µm)	
Isolado	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
PS8	98,7 (26,6 - 170,6)	30,2	2,8 (1,3 - 5,0)	0,6	34,7 (10,1 - 66,9)	11,8
PS23	121,3 (56,9 - 183,9)	30,1	3,6 (2,3 - 4,9)	0,7	33,3 (14,6 - 63,5)	11,1
PS9	102,3 (49,4 - 173,5)	30,2	3,9 (2,6 - 5,9)	0,8	26,1 (11,8 - 59,1)	10,3
PS10	102,8 (55,0 - 192,7)	33,9	3,8 (2,4 - 5,6)	0,8	27,0 (12,9 - 58,2)	11,6
PS11	85,4 (56,5 - 181,5)	22,4	3,3 (2,0 - 4,4)	0,7	26,3 (15,1 - 53,1)	7,9
PS12	86,3 (46,1 - 167,1)	26,3	4,1 (3,0 - 5,6)	0,5	21,3 (11,7 - 44,0)	6,4
PS13	84,1 (53,2 - 151,6)	21,4	4,0 (2,7 - 5,1)	0,6	21,1 (11,1 - 40,3)	6,3
PS14	103,3 (56,0 - 204,0)	29,5	3,9 (2,7 - 5,2)	0,6	26,5 (12,3 - 64,2)	9,0
PS1	67,9 (38,1 - 111,5)	18,7	4,3 (3,5 - 4,9)	0,3	15,7 (9,2 - 26,0)	4,4
PS2	90,6 (51,0 - 176,8)	24,7	4,2 (2,1 - 4,9)	0,6	21,7 (12,1 - 41,7)	5,7
PS3	70,6 (37,4 - 106,6)	17,9	4,1 (3,2 - 5,0)	0,4	17,2 (8,6 - 27,2)	4,8
PS4	70,8 (30,7 - 136,3)	27,3	4,0 (2,6 - 4,9)	0,6	17,9 (7,7 - 36,8)	6,9
PS5	100,0 (58,0 - 149,1)	26,4	2,4 (1,7 - 3,0)	0,3	42,4 (23,7 - 70,2)	12,4
PS6	88,6 (56,7 - 143,7)	20,2	4,0 (1,8 - 5,3)	0,7	22,1 (12,7 - 44,7)	6,2
PS7	59,0 (27,6 - 89,9)	16,1	2,6 (1,5 - 4,2)	0,6	22,4 (9,6 - 37,3)	7,1
PS24	82,8 (51,5 - 154,9)	23,3	2,4 (1,2 - 3,9)	0,6	34,3 (16,6 - 95,7)	16,2
PS19	66,4 (43,8 - 94,7)	12,7	3,6 (2,3 - 4,7)	0,5	18,7 (12,4 - 27,9)	3,7
PS17	87,9 (44,8 - 177,2)	29,7	4,0 (1,8 - 5,4)	0,7	22,0 (11,2 - 44,6)	7,2
PS21	78,1 (47,6 - 118,9)	17,8	3,5 (2,6 - 5,6)	0,7	22,2 (12,1 - 37,7)	5,4

4.3. Avaliação do crescimento micelial *in vitro*

O diâmetro final (D_F) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) diferiram entre as colônias dos 19 isolados estudados ($p>0,05$) (Figuras 5 e 6, e Tabela 3). Os isolados podem ser separados em três grupos. Os isolados com o crescimento lento no primeiro experimento foram o PS23, PS12, PS24 e PS21 (Figura 5), os quais apresentaram tamanho final entre 40 e 44 mm (Tabela 3). Os isolados que apresentaram maiores crescimentos foram o PS14, PS10, PS9, PS6, PS7, PS4, PS2 e PS8 (Figura 5) com o diâmetro final variando entre 51 e 55 mm (Tabela 3). No segundo experimento, apenas um isolado se destacou apresentando o maior IVCM, o isolado PS8 (Figura 6), o qual apresentou o diâmetro final de 57 mm (Tabela 3). O isolado PS24 utilizado nas inoculações no teste de patogenicidade apresentou, em ambos os experimentos, um baixo IVCM (Figuras 5 e 6) e diâmetro final de 41,8 e 38,1 mm, respectivamente (Tabela 3).

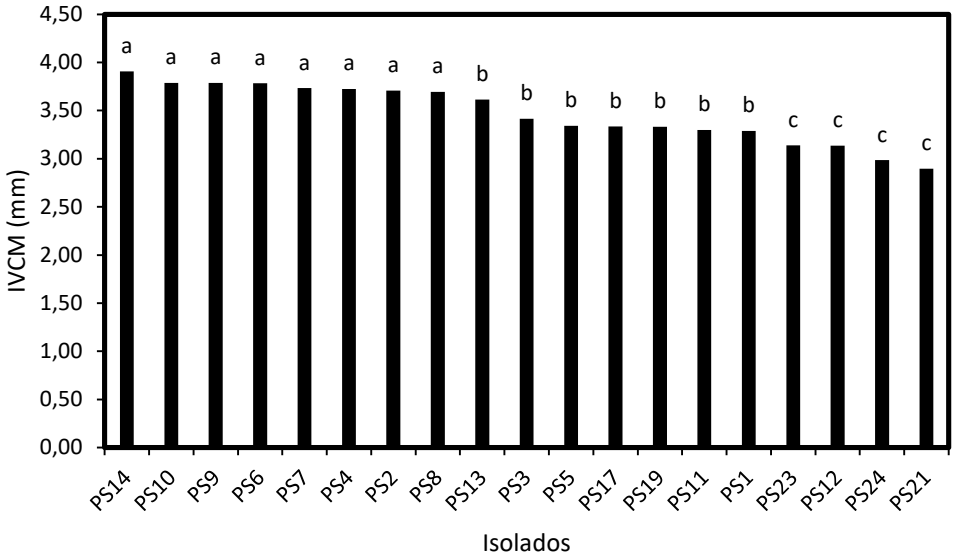

Figura 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em mm, ao longo de 15 dias, dos 19 isolados monospóricos obtidos de frutos de goiabas com sintomas de pinta rosa. Experimento 1. Coeficiente de variação: 5,14%.

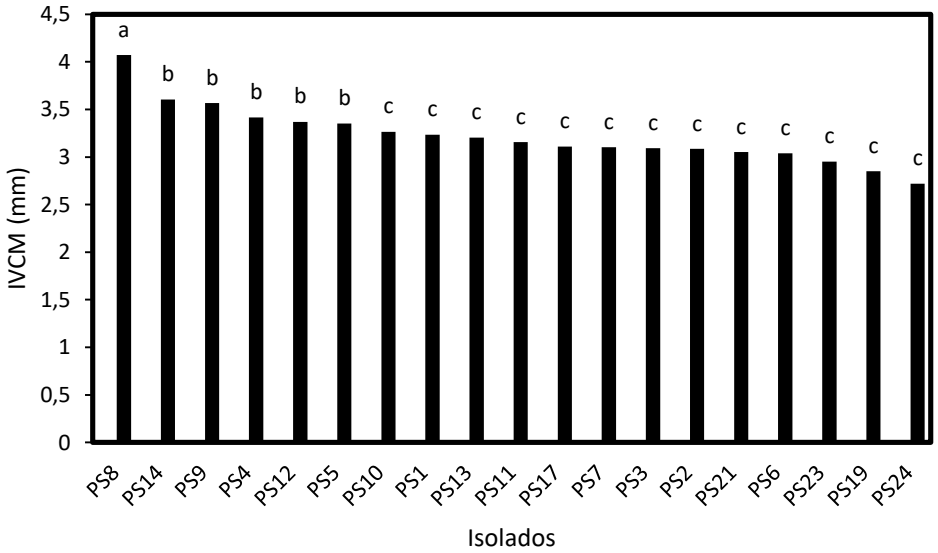

Figura 6. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em mm, ao longo de 15 dias, dos 19 isolados monospóricos obtidos de frutos de goiaba com sintomas de pinta rosa. Experimento 2. Coeficiente de variação: 7,25%.

Tabela 3. Diâmetro final médio das colônias dos 19 isolados monospóricos obtidos de frutos de goiabas com sintomas de pinta rosa, avaliadas no último (7º) dia de medição em dois experimentos diferentes.

Experimento 1	D_F (mm)[1]		Experimento 2	D_F (mm)[1]	
PS14	54,74	a	PS8	57,00	a
PS10	53,04	a	PS14	50,48	b
PS9	53,04	a	PS9	49,91	b
PS6	53,02	a	PS4	47,82	b
PS7	52,24	a	PS12	47,18	b
PS4	52,15	a	PS5	46,95	b
PS2	51,92	a	PS10	45,70	c
PS8	51,71	a	PS1	45,28	c
PS13	50,62	b	PS13	44,86	c
PS3	47,84	b	PS11	44,16	c
PS5	46,79	b	PS17	43,56	c
PS17	46,72	b	PS7	43,44	c
PS19	46,67	b	PS3	43,28	c
PS11	46,17	b	PS2	43,17	c
PS1	46,03	b	PS21	42,74	c
PS23	43,92	c	PS6	42,53	c
PS12	43,86	c	PS23	41,32	c
PS24	41,83	c	PS19	39,91	c
PS21	40,55	c	PS24	38,08	c

[1]Médias seguidas da mesma letra em colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

4.4. Análises filogenéticas

Os fragmentos gerados pela amplificação da PCR dos 19 isolados originados desse trabalho foram de 481, 315 e 218 pb (incluindo alinhamentos com “gaps”), para as regiões ITS, TEF e ACT, respectivamente. Essas sequências, juntamente com as sequências de espécies do gênero *Cercospora*, obtidas no GenBank, totalizaram 61 sequências, incluindo o outgroup *Cercospora chenopodii*, utilizado para todas as análises filogenéticas (Tabela 4). Para a análise filogenética concatenada dos genes utilizados, os limites foram: ITS: 1-481, TEF: 482-796 e ACT: 797-1111, com 1111 caracteres. Para a inferência Bayesiana, os modelos de evolução baseados no critério AIC foram (SYM) para ITS, (HKY+G) para TEF e (GTR+G) para ACT.

Na análise filogenética das sequências de ITS (Figura 7), foram formados poucos clados entre as espécies utilizadas, seis isolados obtidos neste trabalho ficaram em um mesmo clado e não se agruparam a outras espécies de *Cercospora*,

enquanto os demais isolados obtidos neste trabalho se agruparam a outras espécies de *Cercospora* em dois clados distintos. Para a análise filogenética das sequências de TEF (Figura 8), 13 isolados obtidos neste trabalho agruparam-se em um mesmo clado separado das outras espécies e 6 isolados agruparam-se no mesmo clado que *C.* cf. *richardiicola.* Na análise filogenética das sequências de ACT (Figura 9), 12 isolados obtidos neste trabalho agruparam-se a 3 espécies distintas de *Cercospora* fomando um clado, 5 isolados agruparam-se a *C. samambaiae* formando outro clado, 1 isolado agrupou-se a duas espécies de *Cercospora* e 1 isolado não se agrupou a nenhuma espécie dentro do mesmo clado.

A análise filogenética das sequências dos genes concatenados (Figura 10) apresentou diferenças entre os 19 isolados deste estudo, sendo que 7 deles ficaram em um mesmo clado e 6 em um subclado dentro desse clado, totalizando 13 isolados dos 19 analisados. Esses isolados aproximaram-se a *C. samambaiae*, diferenciando-se das demais espécies comparadas. Para os outros 6 isolados, 4 ficaram no mesmo clado, os quais agruparam com *Cercospora* cf. *richardiicola* e 2 ficaram em um subclado dentro desse clado. O isolado PS17, que mostrou-se patogênico no segundo teste de patogenicidade realizado, agrupou-se nesse último clado. O isolado PS21 que foi isolado da goiaba com pinta rosa obtida no primeiro teste de patogenicidade, ficou no mesmo clado que o isolado PS24 que foi o isolado utilizado no primeiro teste de patogenicidade, responsável por causar a pinta rosa nas goiabas inoculadas. Esses isolados agruparam-se a *Cercospora* cf. *richardiicola.*

Tabela 4. Isolados de *Cercospora* spp. utilizados na análise filogenética, código do isolado, hospedeiro, origem e acesso GenBank (continua)

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso do GenBank[1]		
				ITS	TEF	ACT
Cercospora spp.	PS1	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893254	MK902744	MN177948
Cercospora sp.	PS2	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893255	MK902745	MN177949
Cercospora sp.	PS3	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893256	MK902746	MN177950
Cercospora sp.	PS4	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893257	MK902747	MN177951
Cercospora sp.	PS5	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893258	MK902748	MN177952
Cercospora sp.	PS6	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893259	MK902749	MN177953
Cercospora sp.	PS7	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893260	MK902750	MN177954
Cercospora sp.	PS8	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893261	MK902751	MN177955
Cercospora sp.	PS9	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893262	MK902752	MN177956
Cercospora sp.	PS10	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893263	MK902753	MN177957
Cercospora sp.	PS11	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893264	MK902754	MN177958
Cercospora sp.	PS12	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893265	MK902755	MN177959
Cercospora sp.	PS13	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893266	MK902756	MN177960
Cercospora sp.	PS14	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893267	MK902757	MN177961
Cercospora sp.	PS17	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893268	MK902758	MN177962
Cercospora sp.	PS19	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893269	MK902759	MN177963
Cercospora sp.	PS21	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893270	MK902760	MN177964
Cercospora sp.	PS23	*Psidium guajava*	Brasil: São Paulo	MK893271	MK902761	MN177965
Cercospora sp.	PS24	*Psidium guajava*	Brasil: Paraná	MK893272	MK902762	MN177966
Cercospora achyranthis	CBS 132613	*Achyranthes japonica*	South Korea: Jeju	JX143523	JX143277	JX143031
Cercospora agavicola	CBS 117292	*Agave tequilana var. azul*	Mexico: Penjamo	AY647237	AY966897	AY966898
Cercospora alchemillicola	CPC 5259 (TIPO)	*Alchemilla mollis*	New Zealand: Auckland	JX143525	JX143279	JX143033
Cercospora cf. alchemillicola	CPC 5126	*Oenothera fruticosa*	New Zealand: Auckland	JX143526	JX143280	JX143034
Cercospora apii	CBS 116455	*Apium graveolens*	Germany: Heilbron	AY840519	AY840486	AY840450

Tabela 4. Isolados de *Cercospora* spp. utilizados na análise filogenética, código do isolado, hospedeiro, origem e acesso GenBank (continua)

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso do GenBank[1]		
				ITS	TEF	ACT
Cercospora apiicola	CBS 116457	*Apium sp.*	Venezuela: Caripe	AY840536	AY840503	AY840467
Cercospora beticola	CBS 116454	*Beta vulgaris*	Germany	AY840526	AY840493	AY840457
Cercospora cf. brunkii	CBS 132657	*Geranium thunbergii*	South Korea: Namyangju	JX143559	JX143313	JX143067
Cercospora campi-silii	CBS 132625	*Impatiens noli-tangere*	South Korea: Inje	JX143561	JX143315	JX143069
Cercospora canescens	CBS 111133	*Vigna sp.*	South Africa: Potchefstroom	AY260065	DQ835084	DQ835103
Cercospora celosiae	CBS 132600	*Celosia argentea var. cristata*	South Korea: Chuncheon	JX143570	JX143326	JX143080
Cercospora chenopodii	CBS 132620	*Chenopodium cf. album*	France: Ardeche	JX143571	JX143327	JX143081
Cercospora chinensis	CBS 132612	*Polygonatum humile*	South Korea: Pyeongchang	JX143578	JX143334	JX143088
Cercospora corchori	MUCC 585	*Corchorus olitorius*	Japan: Shimane	JX143584	JX143342	JX143096
Cercospora cf. coreopsidis	CBS 132598	*Coreopsis lanceolata*	South Korea: Seoul	JX143585	JX143343	JX143097
Cercospora delaireae	CBS 132595	*Delairea odorata*	South Africa: Long Tom Pass	JX143587	JX143345	JX143099
Cercospora dispori	CBS 132608	*Disporum viridescens*	South Korea: Pyeongchang	JX143591	JX143349	JX143103
Cercospora cf. erysimi	CBS 115059	*Erysimum mutabile*	New Zealand: Manurewa	JX143592	JX143350	JX143104
Cercospora euphorbiae-sieboldianae	CBS 113306 (TIPO)	*Euphorbia sieboldiana*	South Korea: Samcheok	JX143593	JX143351	JX143105
Cercospora fagopyri	CBS 132623	*Fagopyrum esculentum*	South Korea: Yangpyeong	JX143594	JX143352	JX143106
Cercospora cf. flagellaris	CBS 113127	*Eichhornia crassipes*	USA: Texas	DQ835075	AF146147	DQ835121
Cercospora cf. helianthicola	MUCC 716	*Helianthus tuberosus*	Japan: Wakayama	JX143615	JX143374	JX143128
Cercospora cf. ipomoeae	CBS 132639	*Persicaria thunbergii*	South Korea: Pocheon	JX143616	JX143375	JX143129
Cercospora kikuchii	CBS 12827	*Glycine soja*	Japan	DQ835070	DQ835088	DQ835107
Cercospora lactucae-sativae	CBS 132604	*Ixeris chinensis subsp. strigosa*	South Korea: Chuncheon	JX143621	JX143380	JX143134
Cercospora cf. malloti	MUCC 575	*Cucumis melo*	Japan: Okinawa	JX143625	JX143384	JX143138
Cercospora mercurialis	CBS 54971	*Mercurialis annua*	Romania: Cheia	JX143627	JX143386	JX143140
Cercospora cf. modiolae	CPC 5115	*Modiola caroliniana*	New Zealand	JX143630	JX143389	JX143143
Cercospora cf. nicotianae	CBS 13132	*Nicotiana tabacum*	Indonesia: Medan	DQ835073	DQ835099	DQ835119
Cercospora olivascens	CBS 25367	*Aristolochia clematidis*	Romania: Cazanele Dunarii	JX143632	JX143391	JX143145

Tabela 4. Isolados de *Cercospora* spp. utilizados na análise filogenética, código do isolado, hospedeiro, origem e acesso GenBank (conclusão)

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso do GenBank[1]		
				ITS	TEF	ACT
Cercospora cf. physalidis	CBS 76579	*Solanum tuberosum*	Peru	JX143633	JX143392	JX143146
Cercospora polygonacea	CBS 132614	*Persicaria longiseta*	South Korea: Cheongju	JX143637	JX143396	JX143150
Cercospora punctiformis	CBS 132626	*Cynanachum wilfordii*	South Korea: Bonghwa	JX143638	JX143397	JX143151
Cercospora cf. resedae	CBS 118793	*Reseda odorata*	New Zealand: Auckland	JX143639	JX143398	JX143152
Cercospora cf. richardiicola	CBS 132627	*Ajuga multiflora*	South Korea: Incheon	JX143640	JX143399	JX143153
Cercospora ricinella	CBS 132605	*Ricinus communis*	South Korea: Chuncheon	JX143646	JX143405	JX143159
Cercospora cf. sigesbeckiae	CBS 132601	*Sigesbeckia glabrescens*	South Korea: Chuncheon	JX143650	JX143409	JX143163
Cercospora samambaiae	CPC 24673	*Thelypteris dentata*	Brazil	KT037514	KT037474	KT037596
Cercospora sojina	CPC 17964	*Glycine max*	Argentina	JX143662	JX143422	JX143176
Cercospora vignigena	CBS 132611	*Vigna unguiculata*	South Korea: Jeongeup	JX143734	JX143493	JX143247
Cercospora zebrina	CBS 114359	*Hebe sp.*	New Zealand	JX143746	JX143508	JX143262
Cercospora cf. zinniae	CBS 132624	*Zinnia elegans*	South Korea: Yangpyeong	JX143756	JX143518	JX143272

[1] Acesso ao Genbank iniciado com MK e MN foram obtidos nesse estudo.

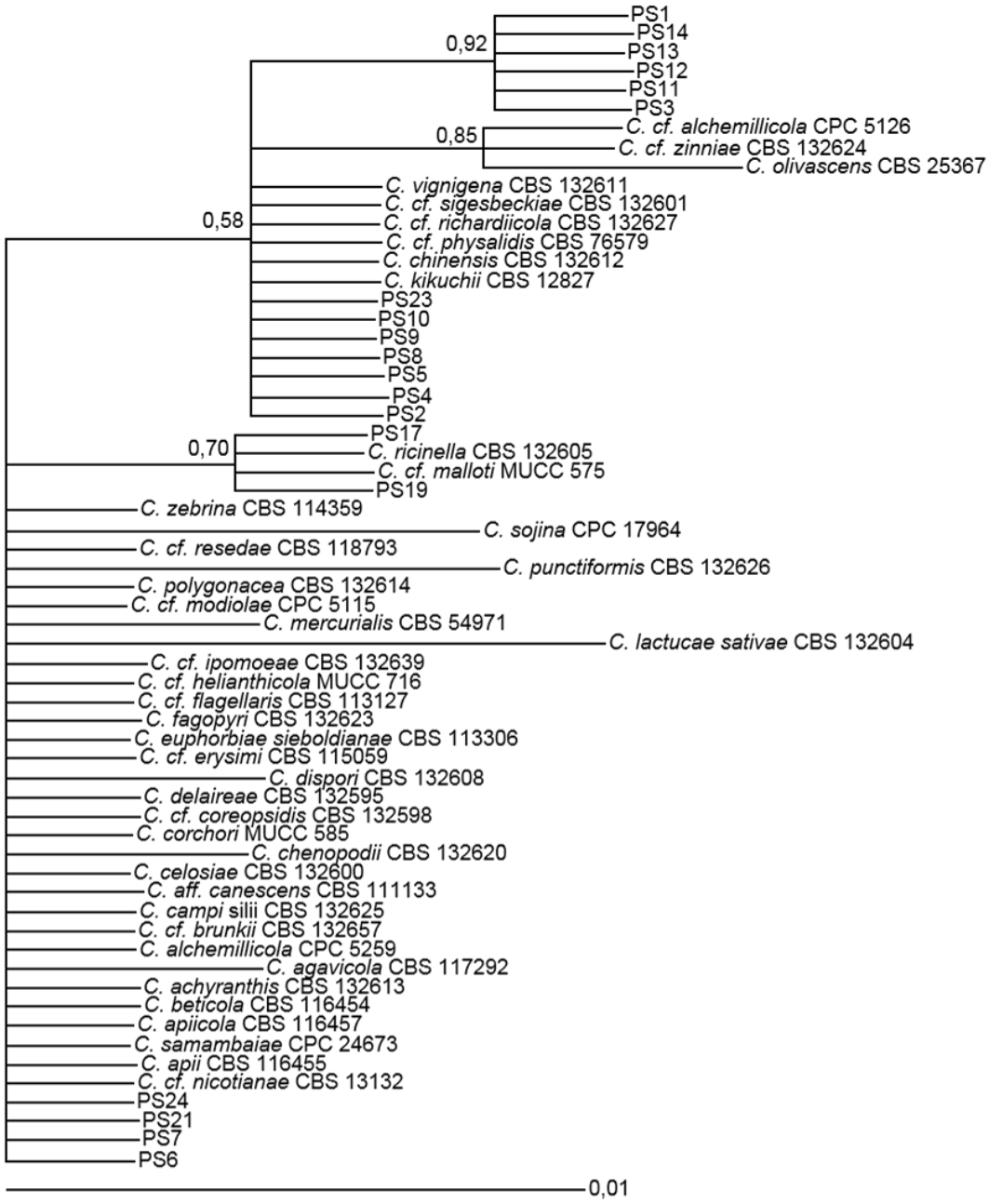

Figura 7. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de um de um alinhamento baseado nas sequencias de ITS de 61 isolados de *Cercospora* spp., os quais incluem isolados de diversas espécies e os isolados obtidos de frutos de goiaba com sintomas de pinta rosa. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados acima dos ramos

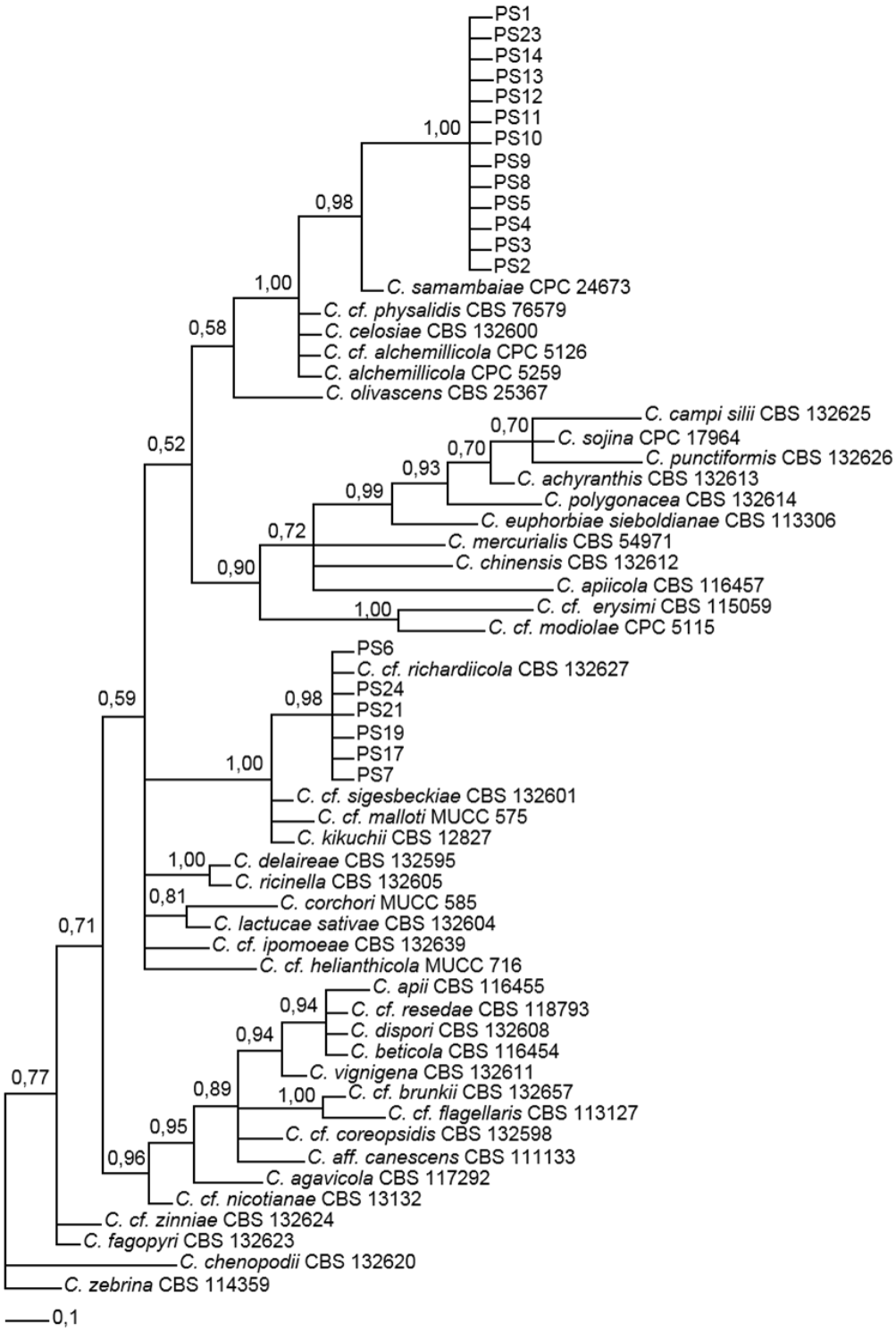

Figura 8. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de um de um alinhamento baseado nas sequencias de TEF de 61 isolados de *Cercospora* spp., os quais incluem isolados de diversas espécies e os isolados obtidos de frutos de goiaba com sintomas de pinta rosa. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados acima dos ramos

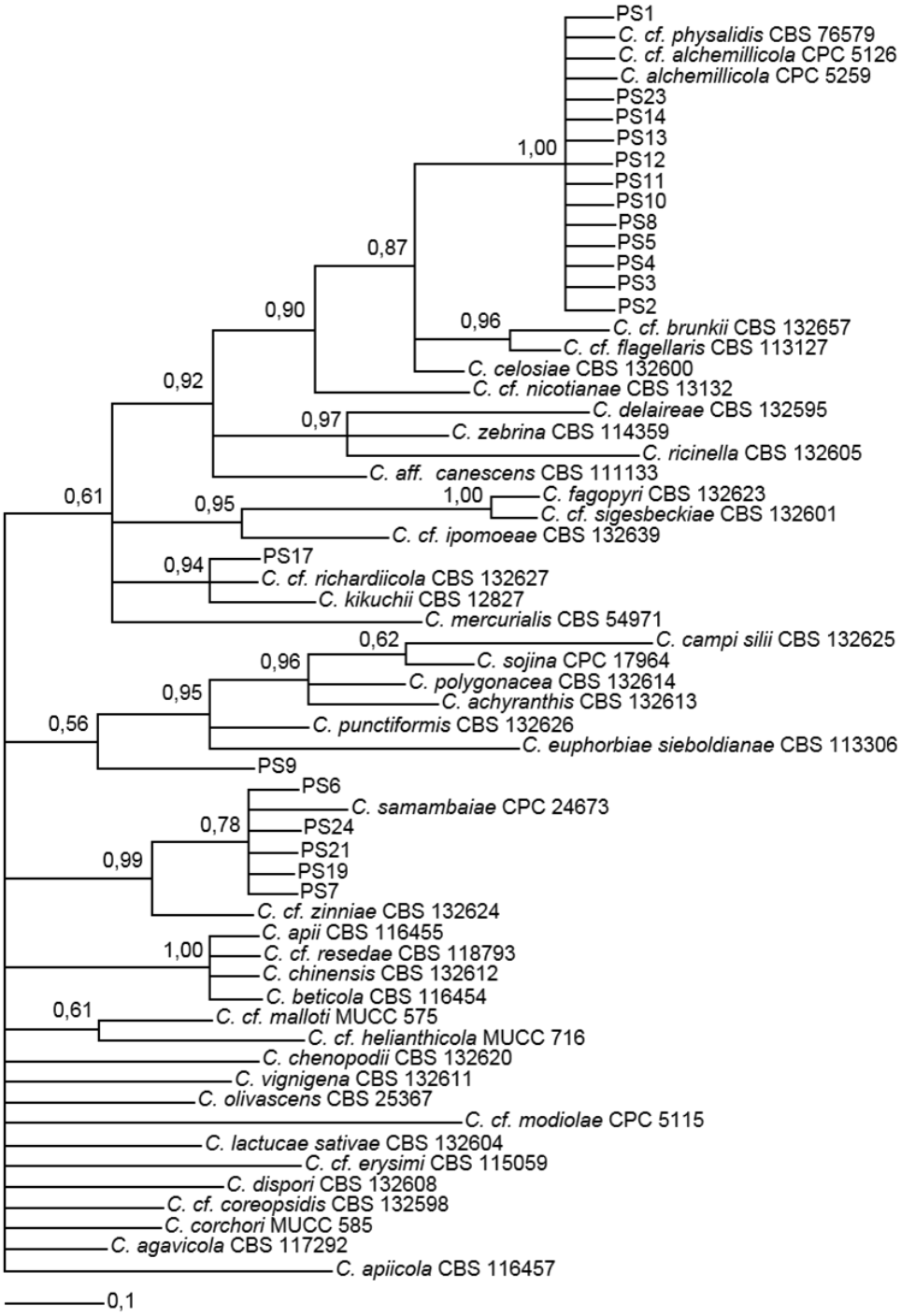

Figura 9. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de um de um alinhamento baseado nas sequencias de ACT de 61 isolados de *Cercospora* spp., os quais incluem isolados de diversas espécies e os isolados obtidos de frutos de goiaba com sintomas de pinta rosa. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados acima dos ramos

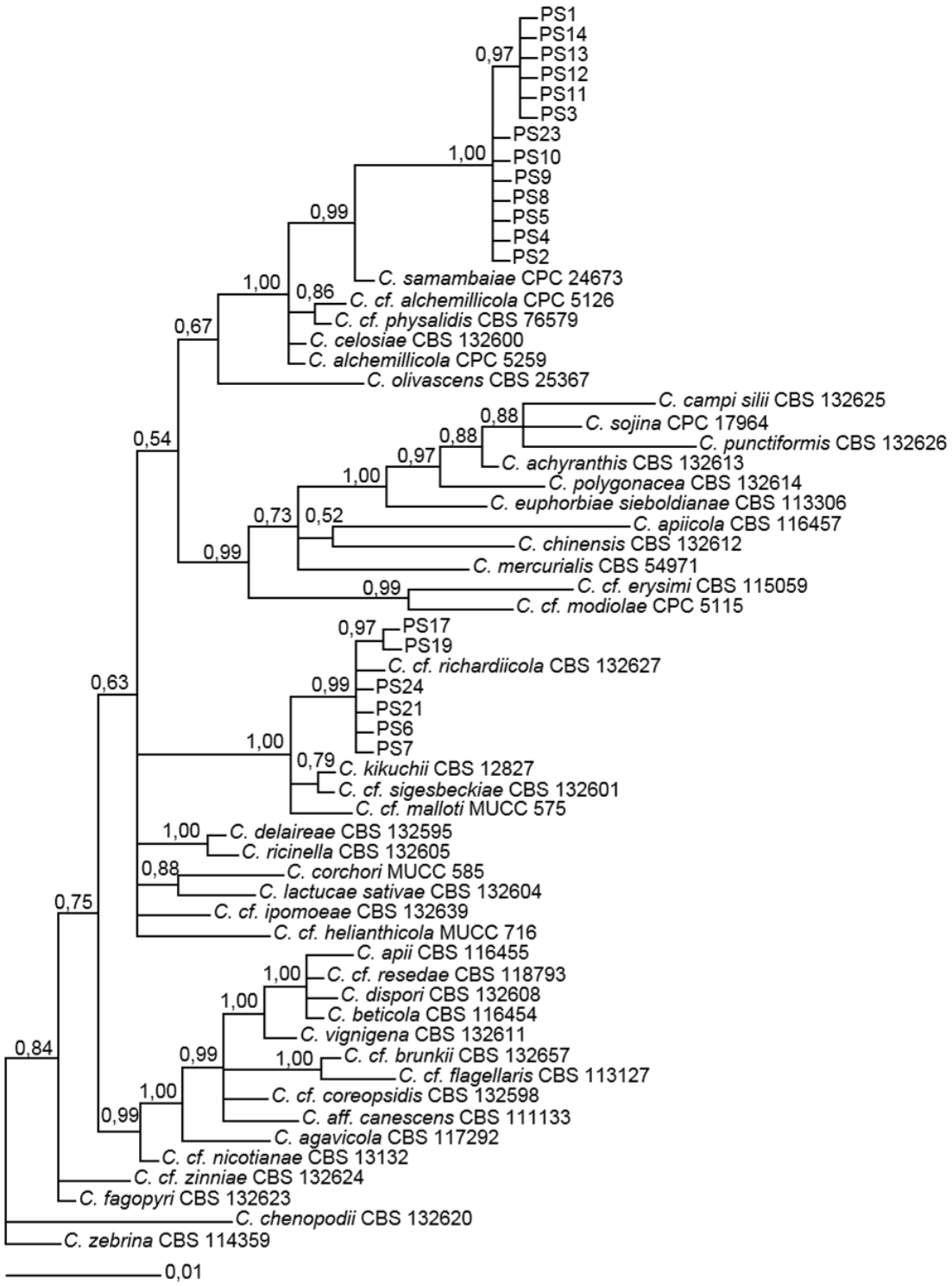

Figura 10. Árvore filogenética construída por Inferência Bayesiana de 61 isolados de *Cercospora* spp., de forma concatenada dos genes ITS, TEF e ACT com isolados de diversas espécies e os isolados obtidos de frutos de goiabas com sintomas de pinta rosa. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados acima dos ramos

4.5. Diversidade intraespecífica

As análises da diversidade intraespecífica resultaram na formação de quatro redes de haplótipos, sendo uma para cada gene (ITS, TEF e ACT) e uma concatenando todos os genes analisados. Para os genes ITS e ACT, os 19 isolados obtidos neste trabalho foram separados em quatro diferentes haplótipos e para o gene TEF em dois diferentes haplótipos, os quais apresentaram maior número de bases distintas entre si, quando comparados aos haplótipos dos demais genes (Figura 11). A rede de haplótipos de forma concatenada separou os isolados em quatro haplótipos distintos (Figura 12 e Tabela 5).

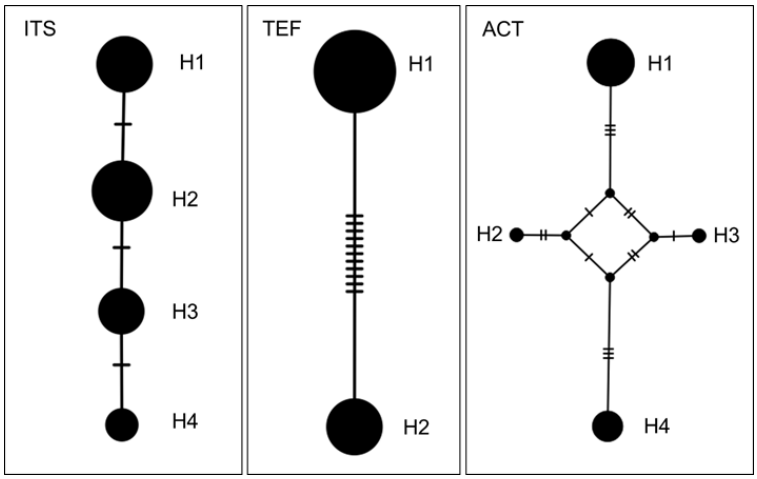

Figura 11. Rede de haplótipo individual para os genes ITS, TEF e ACT de 19 isolados obtidos de lesões de pinta rosa de frutos de goiaba. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (CLEMENT et al., 2000). Cada círculo representa diferentes haplótipos (H1-4) e o tamanho deles corresponde ao número de isolados incluídos no haplótipo. Os quatro círculos menores presentes no haplótipo do gene ACT indicam haplótipos hipotéticos não detectados no conjunto de dados

Figura 12. Rede de haplótipo dos genes ITS, TEF e ACT de forma concatenada de 19 isolados obtidos lesões de pinta rosa de frutos de goiaba. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (CLEMENT et al., 2000). Cada círculo representa diferentes haplótipos (H1-4) e o tamanho deles corresponde ao número de isolados incluídos no haplótipo.

Tabela 5. Haplótipos encontrados na população, utilizando os genes ITS, TEF e ACT de forma concatenada de 19 isolados obtidos de lesões de pinta rosa de frutos de goiaba, pelo programa DNASP v. 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

Haplótipos (4)	Isolados
H1	PS1 PS3 PS11 PS12 PS13 PS14
H2	PS2 PS4 PS5 PS8 PS9 PS10 PS23
H3	PS6 PS7 PS21 PS24
H4	PS17 PS19

Os 19 isolados obtidos de lesões de pinta rosa em frutos de goiaba, coletados nesse trabalho, foram separados em quatro haplótipos. Os isolados do haplótipo H1 são de frutos coletados nos municípios de Elias Fausto/SP (4 isolados) e Carlópolis/PR (2 isolados); os isolados do haplótipo H2 são de frutos coletados nos municípios de Elias Fausto/SP (4 isolados) e Carlópolis/PR (3 isolados); os isolados do haplótipo H3 são de frutos coletados nos municípios de Carlópolis/PR (3 isolados) e Piracicaba/SP (1 isolado); e os isolados do haplótipo H4 são de frutos coletados exclusivamente no município de Piracicaba/SP (2 isolados) (Tabela 1 e 5).

Pelos resultados da rede de haplótipos concatenada pode-se observar uma maior similaridade entre os isolados de Elias Fausto/SP e Carlópolis/PR (haplótipos H1 e H2) e entre Carlópolis/PR e Piracicaba/SP (haplótipo H3). Não existe similaridade entre os isolados de Elias Fausto/SP e Piracicaba/SP, mesmo com a curta distância entre os dois municípios, 80 km.

4.6. Análises ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As eletromicrografias das goiabas realizadas 24 horas após a inoculação (hai) com o isolado PS24 estão apresentadas nas Figuras 13A-H. A germinação conidial seguiu um padrão aleatório, sendo emitidos de três a cinco tubos germinativos por conídio. Os tubos germinativos formados apresentaram crescimento direcionado aos estômatos. Foi possível observar a penetração pelo tubo germinativo através de um estômato aberto (Figura 13D-G), enquanto outras vezes pode-se observar o tubo germinativo passando por cima de estômatos fechados ou abertos sem penetrá-los (Figura 13B-C). Não foi observada a formação de apressório e nem penetração direta.

Foi observado a formação de conidióforos em fascículo emergindo através dos estômatos (Figura 13H).

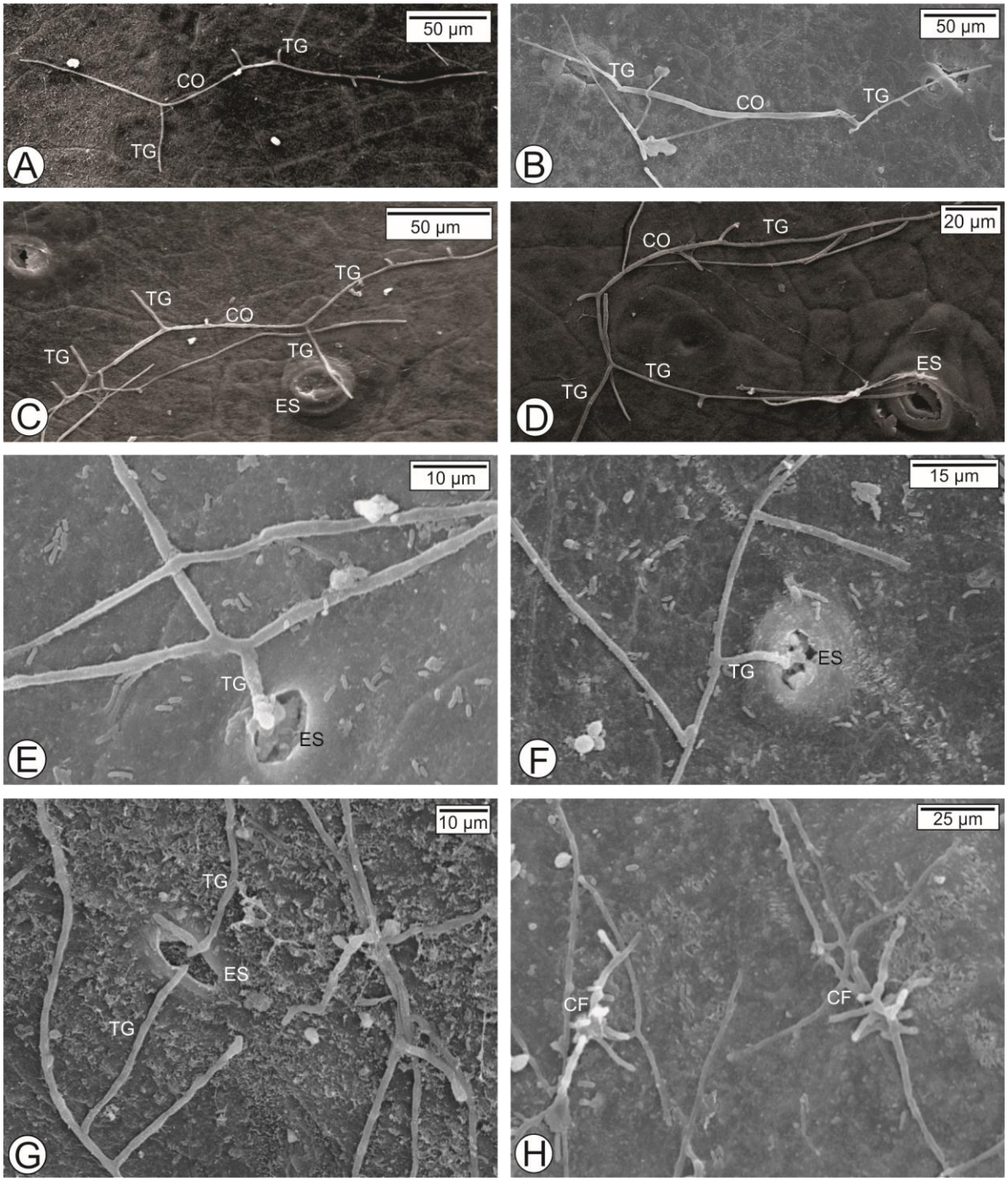

Figura 13. Eletromicrografias de varredura de goiabas da variedade Paluma. A-D. Goiaba inoculada com o isolado PS24, 24 h após a inoculação. A e B. Conídio com vários tubos germinativos. C. Tubo germinativo passando por um estômato fechado sem penetrá-lo. D. Tubo germinativo penetrando um estômato aberto. E-H. Goiaba com lesão de pinta rosa. E-G. Penetração via estômato. H. Conidióforos em fascículo emergindo através dos estômatos. ES – estômato; CO – conídio; CF – conidióforo; TG – tubo germinativo.

4.7. Histopatologia

Nas seções transversais do tecido sadio de goiaba ‘Paluma’ observadas em microscópio óptico (Figura 14), verificou-se a presença da epiderme, do tecido parenquimático composto por camadas subepidérmicas de células compactas, arredondadas, poligonais e de diferentes tamanhos, grande quantidade de esclereídeos (Figura 14A), a presença dispersa de estômatos e estruturas secretoras internas (cavidades lisígenas) logo abaixo da epiderme (Figura 14C).

Nas seções transversais dos tecidos lesionados de goiabas com sintomas de pinta rosa, vizualisadas em microscópio óptico, observou-se que os tecidos corados com Azul de Toluidina apresentaram ruptura nas células do tecido parenquimático (Figura 15A). Nos tecidos corados com Cloreto Férrico, houve acúmulo de compostos fenólicos na epiderme, onde os tecidos ficaram mais escuros em tom castanho (Figura 15B). Os tecidos corados com Sudan IV evidenciaram a presença de gotas lipídicas no interior da cavidade lisígena (Figura 15C). Os tecidos corados com Vermelho de Rutênio, indicaram a presença de pectina nas paredes celulares (Figura 15D).

Obsevou-se nas seções transversais dos tecidos lesionados de goiabas com sintomas de pinta rosa, sob luz fluorescente (Figura 16), a presença de hifas próximas aos estômatos (Figura 16B), as hifas apresentaram cor verdes devido ao corante WGA Alexafluor 488, que identifica quitina sob o filtro 5 L. Verificou-se, também, uma quantidade maior de hifas logo abaixo da epiderme, no tecido parenquimático (Figura 16D). Sob o filtro DAP, nas seções coradas com o Calcofluor White, notou-se a presença de celulose na epiderme e nos esclereídeos (Figura 16A e C). Pode-se observar uma possível penetração do patógeno por estômato (Figura 15E-F).

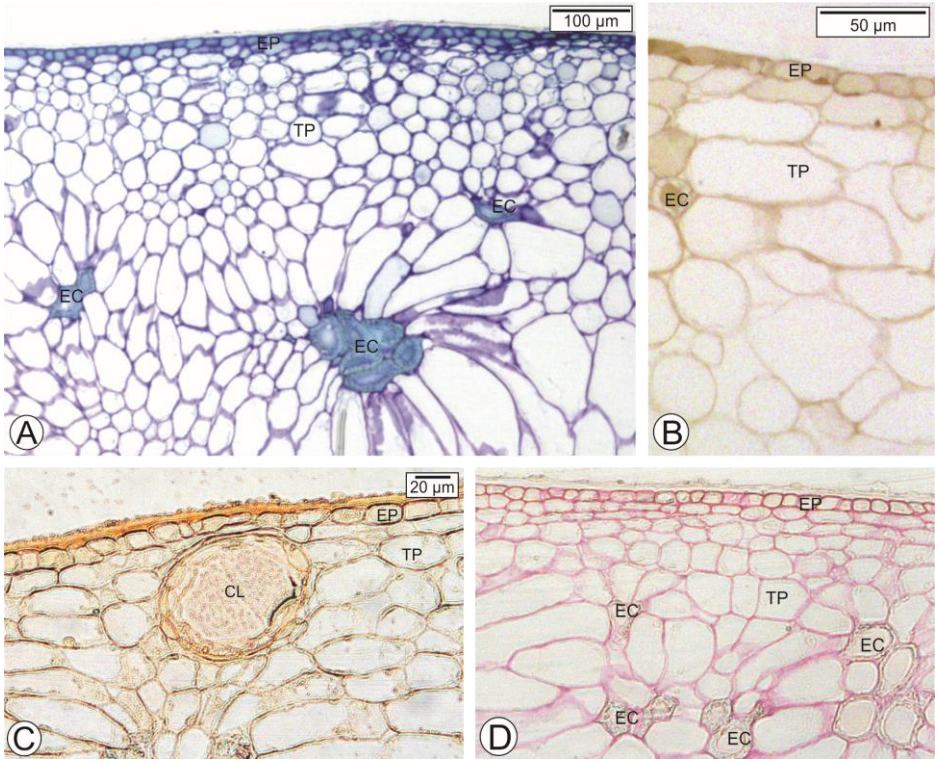

Figura 14. Fotomicrografias da seção transversal do tecido sadio de goiaba 'Paluma'. A. Tecidos corados com Azul de Toluidina. B. Tecidos corados com Cloreto Férrico. C. Tecidos corados com Sudan IV. D. Tecidos corados com Vermelho de Rutênio. EP- Epiderme; EC- Esclereídeo. ES- Estômato; TP – Tecido parenquimático; CL- Cavidade lisígena.

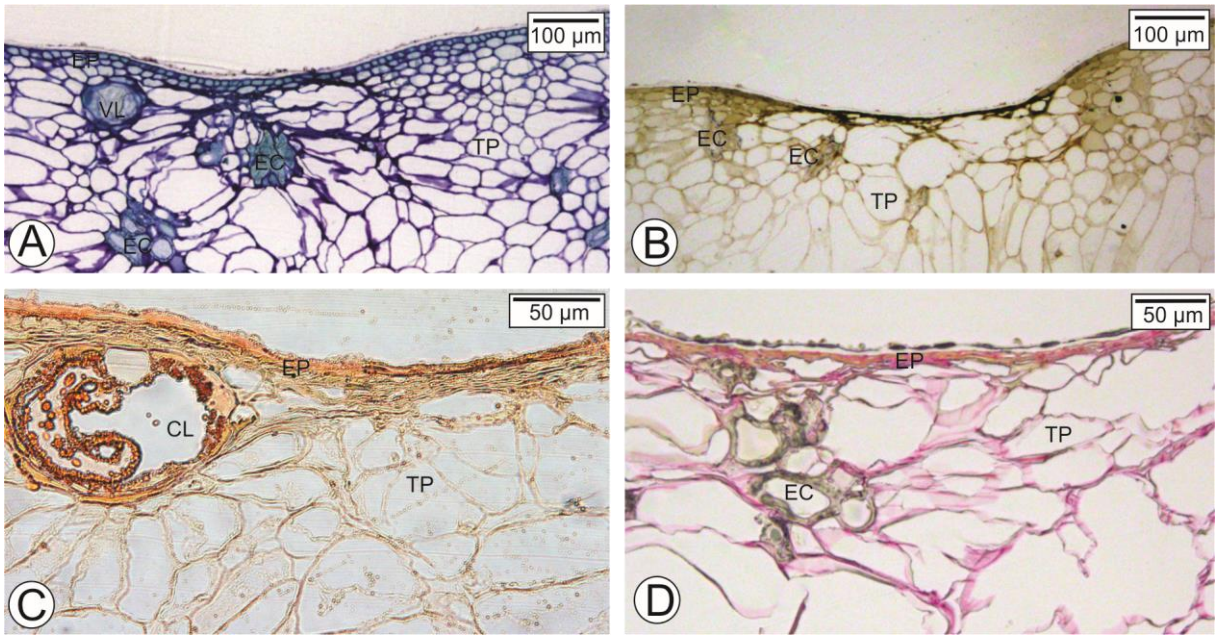

Figura 15. Fotomicrografias da seção transversal do tecido lesionado de goiaba 'Paluma' com sintomas de pinta rosa. A. Tecidos corados com Azul de Toluidina. B. Tecidos corados com Cloreto Férrico, indicando acúmulo de fenol (castanho). C. Tecidos corados com Sudan IV, indicando acúmulo de substâncias lipofílicas, notar a formação de gotas lipídicas no interior da cavidade lisígena. D. Tecidos corados com Vermelho de Rutênio, indicando acúmulo de pectina. EP- Epiderme; EC- Esclereídeo. ES- Estômato; TP – Tecido parenquimático; CL- Cavidade lisígena.

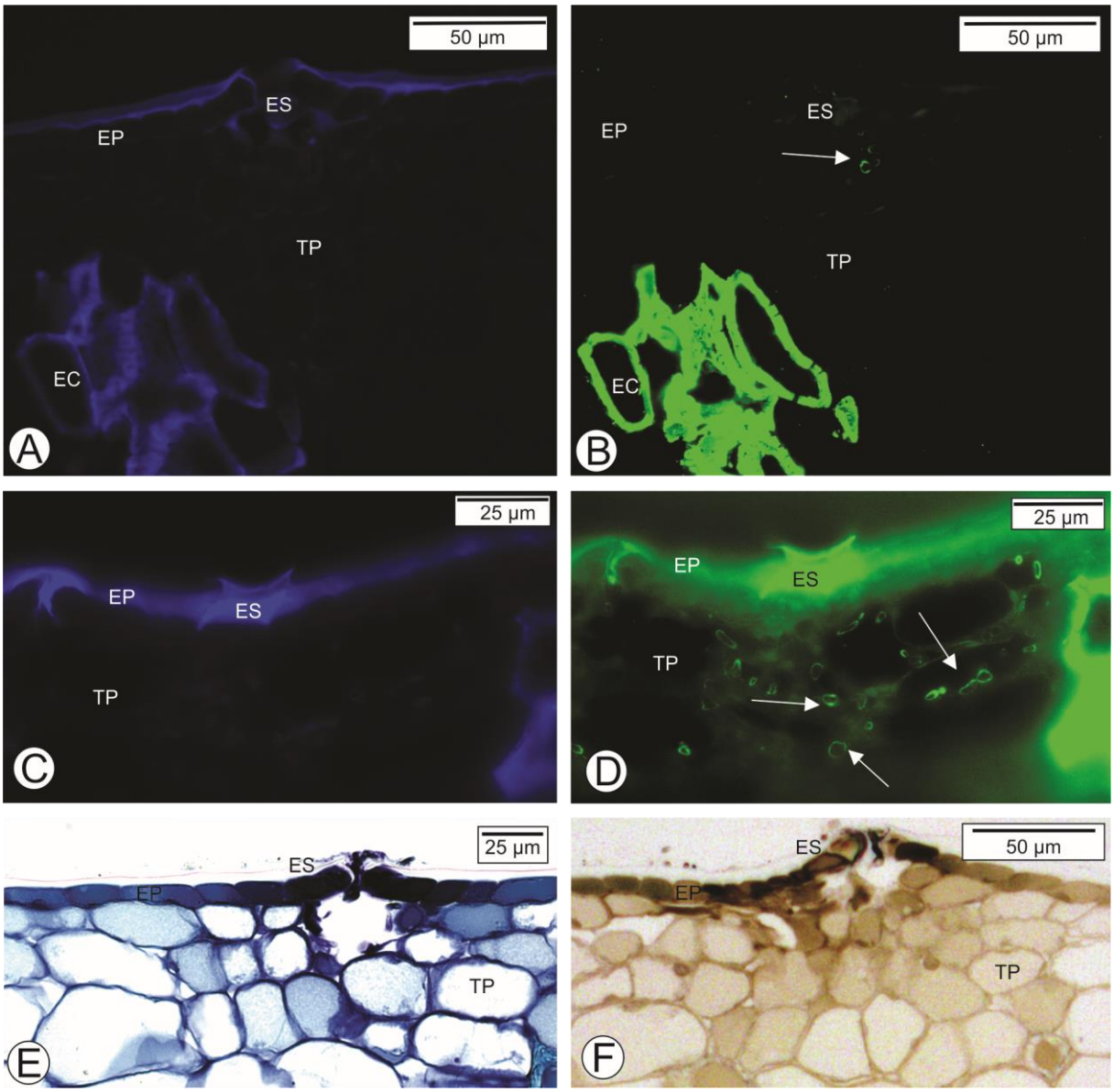

Figura 16. Fotomicrografias da seção transversal da goiaba 'Paluma' com sintomas da pinta rosa da goiaba. A-D. Micrografias de epifluorescência. A e C. Seções analisadas sob o filtro DAP depois de coradas com Calcofluor White, indicando acúmulo de celulose. B e D. Seções analisadas sob o filtro 5 L depois de coradas com WGA Alexafluor 488, notar a presença de hifas no tecido parenquimático próximas ao estômato. E-F. Fungo penetrando através dos estômatos nos tecidos corados com Azul de Toluidina e Cloreto Férrico, respectivamente. EP- Epiderme; EC- Esclereídeo. ES- Estômato; TP – Tecido parenquimático; CL- Cavidade lisígena.

4.8. Produção de cercosporina

Os extratos obtidos por meio da extração da toxina com KOH 5N, resultaram em soluções que variaram de verde translúcido a verde intenso, mostrando diferença entre os isolados obtidos de lesão de pinta rosa em goiabas quanto a produção da toxina. As leituras médias de absorbância a 480 nm variaram de 0,006

a 1,109 por isolado, que correspondem ao acúmulo médio de 0,34 a 11,26 nmol de cercosporina por disco, respectivamente. O isolado PS24 apresentou a maior média na concentração de cercosporina por disco de micélio (Tabela 6). Os isolados que apresentaram maior concentração de cercosporina pertencem ao haplótipo H3 (PS24, PS21, PS7, PS19 e PS6) (Tabela 6). Todos os isolados que apresentaram menor concentração de cercosporina pertencem aos hapótipos H1 (PS3, Ps14, PS11, PS12, PS1 e PS13) e H2 (PS23, PS2, PS9, PS10 e PS8) (Tabela 6).

Tabela 6. Médias da concentração de cercosporina por disco de micélio de 19 isolados obtidos de lesões de pinta rosa de frutos de goiaba.

Isolado	Cercosporina (nmol/disco)[1]
PS24	11,26 a
PS21	7,77 b
PS7	7,02 b
PS19	5,16 c
PS6	3,85 d
PS17	3,21 d
PS4	2,96 d
PS5	2,32 d
PS3	1,92 e
PS14	1,40 e
PS23	1,38 e
PS11	1,31 e
PS2	1,16 e
PS9	1,09 e
PS12	1,04 e
PS1	0,74 e
PS10	0,70 e
PS13	0,51 e
PS8	0,34 e

[1]Médias seguidas da mesma letra em colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância. CV = 52,19 %

5. DISCUSSÃO

A doença pinta rosa que causa lesões em frutos de goiabeiras já foi relatada em países, como a Venezuela e África do Sul, entretanto, nesses casos não houve a realização de teste de patogenicidade (FLORES et al., 2009; JACOBS et al., 2014). Nesses países foram isolados fungos de lesões semelhantes à pinta rosa atribuíndo à doença a espécies de *Mycosphaerella* (JACOBS et al., 2014) e à *Phyllosticta psidiicola* (FLORES et al., 2009). No presente trabalho foi possível comprovar, através de teste de patogenicidade, a associação agente causal e hospedeiro entre *Cercospora* spp. e frutos de goiabeira para a doença pinta rosa. Este é primeiro relato do agente causal da doença pinta rosa em frutos de goiabeiras.

Os sintomas observados da doença, por meio do teste de patogenicidade, realizado em casa de vegetação, ocorreram 30 dias após a inoculação, demonstrando um período de incubação relativamente pequeno, quando comparada com outras doenças da goiabeira, como a antracnose (*Colletotrichum* spp.) e a pinta preta (*Guignardia psidii*) (FISCHER et al., 2011; PRUSKY et al., 2013). Contudo, no segundo teste de inoculação, realizado no campo experimental, os sintomas de pinta rosa ocorreram 90 dias após a inoculação, quando os frutos se encontravam maduros.

No caso dessas doenças, a infecção do patógeno ocorre de forma latente ou quiescente, sendo capazes de penetrar nos tecidos vegetais com esses ainda verdes e sobreviver de forma quiescente, causando sintomas nos tecidos quando os frutos amadurecem (PICCININ et al., 2016; PRUSKY e LICHTER, 2007).

Os estudos de caracterização morfológica e cultural dos 19 isolados monospóricos obtidos nesse trabalho, demonstraram uma variação em relação a cor das colônias, cujas cores predominantes foram cinza e branco, sendo a maioria com bordas pigmentadas de rosa. Não foi observado esporos na colônia. Os conídios obtidos dos diferentes isolados mostraram-se homogêneos, sendo caracterizados como filiformes, multisseptados, hialinos e com as bases truncadas. Os conidióforos são eretos, septados, fasciculados e de coloração marrom pálido. O comprimento e a largura dos conídios também foram similares entre os isolados. As características das colônias assim como dos conídios remetem a fungos cercosporioides. Embora, tradicionalmente a análise morfológica tem sido utilizada na identificação de diversas espécies, inclusive do gênero *Cercospora*, esse método mostra-se inadequado

devido a homoplasia entre algumas espécies (CROUS e BRAUN, 2003; GOODWIN et al. 2001; GROENEWALD et al. 2013).

Para se chegar ao gênero com exatidão, foi realizado o sequenciamento dos 19 isolados em estudo e comparados com sequências espécies do gênero *Cercospora* obtidas no GenBank. Os três genes (ITS, TEF e ACT) utilizados nesse estudo para a inferência filogenética têm sido empregados na classificação de espécies de *Cercospora* em diversos estudos (GROENEWALD et al. 2013; BAKHSHI et al. 2015; BAKHSHI et al., 2018). A região ITS apresentou uma menor capacidade em classificar as sequências, sendo indicada para a classificação de gênero e não de espécie. Já as regiões TEF e ACT puderam separar um maior número de sequências. Neste estudo, a análise filogenética da região ITS não foi capaz de distinguir a maioria das espécies. As regiões TEF e ACT, analisadas separadamente, foram capazes de agregar a maioria das espécies em diferentes clados. Na combinação dos três genes, uma parte dos isolados da pinta rosa agrupou-se ao subclado do mesmo clado de *C. samambaiae* e a outra parte foi agrupado ao mesmo clado de *C.* cf. *richardiicola*, evidenciando a variabilidade genética entre os isolados. Contudo, pode-se afirmar que todos os isolados da pinta rosa obtidos nesse estudo pertencem ao gênero *Cercospora*.

A análise da diversidade intraespecífica, aplicado aos 19 isolados estudados, foi realizada de forma separada para cada gene e de forma concatenada, resultando na formação de quatro haplótipos distintos para cada análise, com exceção do gene TEF, que apresentou apenas dois haplótipos. Esses resultados revelam a variabilidade genética entre os isolados e a possibilidade de existir mais de uma espécie associada a pinta rosa da goiaba. A correlação entre os locais de coleta de isolados e os haplótipos obtidos foi negativa. Guillin et al., (2017) estudando isolados de espécies de *Cercospora* associadas a mancha púrpura da semente da soja obtidas nos países Argentina, Brasil, Estados Unidos e Japão, observaram uma alta diversidade haplotípica entre os isolados, a qual os autores sugeriram ocorrer devido a capacidade de reprodução sexual e/ou atividade parassexual das espécies estudadas.

Após a constatação de que os patógenos isolados de lesões de goiabas sintomáticas da pinta rosa foram classificados como fungos pertencentes ao gênero *Cercospora*, foram realizadas análises para caracterizar os isolados quanto a produção da toxina cercosporina. As colônias variaram quanto a cor e algumas

apresentaram pigmentação avermelhada ao redor das colônias, essa pigmentação é causada pela toxina cercosporina (KUYAMA; TAMURA, 1957). A produção dessa toxina é uma característica da maioria das espécies de *Cercosporora* (GOODWIN et al. 2001; JENNS et al. 1989). Diversas culturas de plantas de grande importância econômica sofrem com doenças causadas por espécies de *Cercospora* como *C. beticola*, *C. zeae-maydis*, *C. nicotianae* e *C. coffeicola,* as quais produzem essa toxina (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). A cercosporina é um pigmento de coloração vermelha que foi isolado do fungo *C. kikuchii* e não possui especificidade quanto ao hospedeiro (KUYAMA; TAMURA, 1957). Porém, a produção dessa toxina não é de exclusividade de espécies de *Cercospora*, sendo relatado em *Pseudocercosporella capsellae* (GUNASINGHE et al., 2016) e *Colletotrichum fioriniae* (DE JONGE et al., 2018).

Dos 19 isolados analisados neste trabalho, 13 foram considerados produtores da toxina cercosporina, em concentração que variou de 0,086 a 15,865 nmol por disco de micélio. Resultados diferentes destes foram encontrados por Martins et al., (2007), os quais utilizando a mesma metodologia adotada neste trabalho para a avaliação da produção de cercosporina, observaram que todos os isolados de *C. coffeicola* avaliados produziram cercosporina em concentração que variou de 1,7 a 35,3 nmol por disco de micélio. Entretanto, esses resultados são corriqueiros, uma vez que diversos estudos relataram a variação do nível de concentração da toxina entre espécies diferentes (FAJOLA, 1978; JENNS et al., 1989; YOU et al., 2008) e entre isolados da mesma espécie (ALMEIDA et al., 2005; SOUZA et al., 2012; VALE et al., 2019).

Os isolados que produziram maiores quantidade de cercosporina pertencem ao haplótipo H3 (PS24, PS21, PS7, PS19 e PS6). Os isolados que produziram menores quantidades de cercosporina pertencem aos haplótipos H1 e H2. No segundo teste de patogenicidade realizado utilizou-se um isolado de cada haplótipo. Apenas os isolados PS24 (haplótipo H3) e PS17 (haplótipo H4) expressaram sintomas em frutos de goiaba. Os isolados dos haplótipos H1 e H2 não apresentaram sintomas da doença nos frutos. Esse resultado pode estar relacionado a informação de que a patogenicidade de *Cercospora* spp. deve-se à produção de cercosporina (DAUB; EHRENSHAFT, 2000; ALMEIDA et al., 2005; DAUB; CHUNG, 2007).

As análises histopatológicas da casca da goiaba na região lesionada pelo patógeno da pinta rosa revelaram que as células dos tecidos parenquimáticos se desarranjaram e houve acúmulo de compostos fenólicos. O acúmulo de compostos fenólicos na parede celular está relacionado a defesa das plantas contra o ataque de fitopatógenos. Esse componente pode agir por um princípio tóxico ao patógeno ou pelo fortalecimento da parede celular da planta (HUCKELHOVEN, 2007; BENGTSSON et al., 2014). Como comprovado em diferentes culturas e patógenos (ARAUJO et al., 2015, ANDRADE-HOYOS 2015; TAKEMOTO; MIZUNO 2016; ALVARADO et al. 2019). Entretanto, neste estudo a produção dos compostos fenólicos não impediu que o processo de colonização ocorresse.

Por consequência da formação das lesões na goiaba, as cavidades lisígenas (secretoras de óleos essenciais) presentes no tecido parenquimático se desestruturaram e houve formação de gotas lipídicas no seu interior, fato que não ocorreu nos tecidos sadios. O acúmulo de componentes lipídicos em tecidos lesionados por patógenos fúngicos também foi observado em lesões causadas por *Colletotrichum acutatum* em pétalas de citros (MARQUES et al., 2016), e em lesões causadas por *Guignardia citricarpa* no pericarpo da laranja (MARQUES et al., 2012), nesse último caso a presença de lipídeos não foi detectada nas células em volta das glândulas de óleo em frutos saudáveis, assim como observado nesse trabalho. Esses resultados sugerem que haja uma resposta do hospedeiro à infecção do patógeno, porém esses mecanismos não foram suficientes para impedirem a colonização do patógeno.

Nas análises dos tecidos lesionados sob luz fluorescente, foram encontradas hifas nos tecidos parenquimáticos abaixo da epiderme e próximas aos estômatos, sugerindo que a lesão esteja relacionada com um fungo e que a penetração pelo fungo pode ter ocorrido por aberturas naturais como os estômatos, assim como observado em imagens com microscopia eletrônica de varredura.

Entre as espécies de *Cercospora*, a penetração pode ocorrer através da epiderme como observado em *C. henningsii* em folhas de mandioca (BABU et al. 2009), através da epiderme e via estômato em *Cercospora arachidicola* em amendoim (SMITH et al. 1992) ou somente via estômato em *C. moricola* em amoreira (GUPTA et al.1995) e *Cercospora beticola* em beterraba (RATHAIAH, 1977). As eletromicrografias de varredura obtidas neste estudo revelaram que os conídios do patógeno da pinta rosa emitiram em média de 3 a 5 tubos germinativos

e não formaram apressório. Resultados semelhantes foram encontrados em *Cercospora coffeicola* que apresentou em média 3 tubos germinativos sem a formação de apressório (SOUZA et al., 2011). Não foi observada penetração direta neste estudo, mas alguns tubos germinativos penetraram através dos estômatos. A presença de água livre na superfície reduz o tropismo positivo do tubo germinativo em direção aos estômatos, assim como a formação de apressório, dificultando o processo de infecção (BECKMAN; PAYNE, 1983).

6. CONCLUSÕES

Pelo teste de patogenicidade em goiabas pode-se comprovar que a doença pinta rosa é biótica e é causada por fungo;

Pelos estudos de caracterização morfológica e cultural e pela análise filogenética das sequências obtidas dos isolados do fungo foi possível comprovar que o fungo agente causal da pinta rosa pertence ao gênero *Cercospora*.

A presença de cercosporina na colônia dos isolados do fungo agente causal da pinta rosa corrobora ser o patógeno pertencente ao gênero *Cercospora*.

Portanto, esse é o primeiro relato e comprovação de ser um fungo do gênero *Cercospora* o agente causal da doença pinta rosa da goiaba.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant pathology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

ALMEIDA, Á. M.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R.; BINNECK, E.; SARTORI, F.; COSTAMILAN, L. M.; LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii.* **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 594-602, 2005.

ALVARADO, L. E.; SÁA, S.; CUNEO, I. F.; PEDRESCHI, R.; MORALES, J. A.; LARACH, A.; BESOAIN, X. A. A comparison of immediate and short-term defensive responses to *Phytophthora* species infection in both susceptible and resistant walnut rootstocks. **Plant Disease**, Online, 2019. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-03-19-0455-RE>. Acesso em: 20/09/2019.

AMAYA, D. R.; FARFAN, J. A. Nutrientes e substâncias Bioativas da goiaba (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos na saúde. In: NATALE, W.; ROZANE, D.E.; SOUZA, H.A. de; AMORIN, D.A. de. (Ed.) **Cultura da Goiaba – do plantio à comercialização**. Vol2. Jaboticabal: FCAV, Capes, CNPq, FAPESP, Fundunesp, SBF, 2009.p. 471-488.

ANDRADE-HOYOS, P.; MOLINA, E.; DE LEÓN, C.; ESPÍNDOLA, M.; ALVARADO, D.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, A. Defense mechanisms in avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi* Rands. **Spanish Journal of Rural Development,** v.3, n.4, p. 23-30, 2015.

ARAUJO, L.; BISPO, W. S.; RIOS, V. S.; FERNANDES, S. A.; RODRIGUES, F. A. Induction of the phenylpropanoid pathway by acibenzolar-s-methyl and potassium phosphite increases mango resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. **Plant Disease**, v. 99, n. 4, p. 447-459, 2015.

BABU, A. M.; PHILIP, T.; KARIAPPA, B. K.; KAMBLE, C. K. Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 1, p. 57-62, 2009.

BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, p. 65, 2015.

BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Novel primers improve species delimitation in *Cercospora*. **IMA fungus**, v. 9, n. 2, p. 299, 2018.

BALIS, C.; PAYNE, M. G. Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. P**hytopathology**, v. 61, p. 1477-1484, 1971.

BENGTSSON, T.; HOLEFORS, A.; WITZELL, J.; ANDREASSON, E.; LILJEROTH, E. Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. **Plant Pathology**, v. 63, n. 1, p. 193–202, 2014.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553, 1999.

CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology.** Chicago: The University of Chicago Press, 1932. 416p.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p.1657-1660, 2000.

COSTA, A.F.S.; PACOVA, B.E. Botânica e variedades. In: COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N. (Ed). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 27-56.

CROUS, P. W.; BRAUN, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Pages 1-571 in: CBS Biodiversity Series 1. Unknown publisher.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. **Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease**. Online. APSnet Features, v. 10, p. 2007-0207, 2007. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Cercosporin.aspx>. Acesso em: 01/08/2019.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated cercospora toxin cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 461–490, 2000.

DE JONGE, R.; EBERT, M. K.; HUITT-ROEHL, C. R.; PAL, P.; SUTTLE, J. C.; SPANNER, R. E.; THOMMA, B. P. Gene cluster conservation provides insight into cercosporin biosynthesis and extends production to the genus *Colletotrichum*. Proceedings of the National **Academy of Sciences**, v. 115, n. 24, p. E5459-E5466, 2018.

FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, v. 13, n. 2, p. 157-164, 1978.

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M. D.; ARRUDA, M. C. D.; BERTANI, R. M. D. A.; GARCIA, M. J. D. M.; AMORIM, L. Postharvest damages in guavas from the Midwest region of the State of São Paulo. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 570-576, 2011.

FLORES, Y; RONDÓN, A.; ARNAL, E.; MUJICA, Y.; GARCIA, M.; ROMERO, A. La mancha roja de la guayaba: Síntomas y diseminación en el estado Cojedes, Venezuela. **Bioagro**, v. 21, n. 1, p. 75-77, 2009.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2018**: anuário da produção brasileira. São Paulo, 2018. 480p.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 648-658, 2001.

GRAAF, P. V.; JOSEPH, M. E.; CHARTIER-HOLLIS, J. M.; O'NEILL, T. M. Prepenetration stages in infection of clematis by Phoma clematidina. Plant Pathology, v. 51, n. 3, p. 331-337, 2002.

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C., NISHIKAWA, J.; SHIN, H. D.; PARK, J. H;, JAMA, A. N., CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 115-170, 2013.

GUILLIN, E. A.; DE OLIVEIRA, L. O.; GRIJALBA, P. E.; GOTTLIEB, A. M. Genetic entanglement between *Cercospora* species associating soybean purple seed stain. **Mycological Progress**, v. 16, n. 6, p. 593–603, 2017.

GUNASINGHE, N.; YOU, M. P.; CAWTHRAY, G. R.; BARBETTI, M. J. Cercosporin from *Pseudocercosporella capsellae* and its critical role in white leaf spot development. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1521–1531, 2016.

GUPTA, V. P.; TEWARI, S. K.; BAJPAI, A. K.; DATTA, R. K. Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process in mulberry. **Sericologia** (France), n. 35, p.123–128, 1995.

HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliar motion. **Science**, Washington, v. 13, n. 3869, p. 871-818, 1969.

HÜCKELHOVEN, R. Cell wall–associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 101-127, 2007.

HYUN, J. W. et al. Pathotypes and genetic relationship of worldwide collections of *Elsinoë* spp. causing scab diseases of citrus. **Phytopathology**, v. 99, n. 6, p. 721-728, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <http//www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 20/06/2019.

JACOBS, A.; TRUTER, M.; SCHOEMAN, M.H. Characterization of *Mycosphaerella* species associated with pink spot on guava in South Africa. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 110, n. 9-10, p. 01-06, 2014.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 213-219, 1989.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biol, New York**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KUYAMA, S.; TAMURA, T. Cercosporin. A pigment of *Cercosporina kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 21, p. 5725-5726, 1957.

LEIGH, J.W.; BRYANT, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 1110-1116, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 1451-1452, 2009.

MADDISON W.P.; MADDISON D.R., 2011. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Version 2.75. Disponível em <http://mesquiteproject.org>. Acesso em: 20/01/2018.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Fruticultura tropical: goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 373 p.

MARQUES, J. P. R.; AMORIM, L.; SPÓSITO, M. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Ultrastructural changes in the epidermis of petals of the sweet orange infected by *Colletotrichum acutatum*. **Protoplasma**, v. 253, n. 5, p. 1233–1242, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-015-0877-3>.

MARQUES, J. P. R.; SPÓSITO, M. B.; MELLO, A. F. S.; AMORIM, L.; MONDIN, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histopathology of black spot symptoms in sweet oranges. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 2, p. 439–448, 2012.

MARTINS, R. B. Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa e produção de cercosporina. Tese, Universidade Federal de Viçosa. 2007.

NYLANDER J.; MrModeltest v2.3 Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAGE, R. D. M. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied.** 3rd ed. London: Churchill, 1968. v. 1, 998 p.

PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira.** Jaboticabal: FUNEP, 1995. 47 p.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIETRO, R.M.; CIA, P.; da SILVA, B.M.P. **Doenças da goiabeira.** In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E A. (Ed.). Manual de fitopatologia. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v.2 772 p.

PRUSKY, D.; ALKAN, N.; MENGISTE, T.; FLUHR, R. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p.

PRUSKY, D.; LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS microbiology letters**, v. 268, n. 1, p. 1-8, 2007. 5-176, 2013.

R CORE TEAM: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado em: 07/05/2019.

RASERA, J. B.; AMORIM, L.; MARQUES, J. P. R.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histopathological evidences of early grapevine leaf senescence caused by *Phakopsora euvitis* colonization. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 108, p. 101434, 2019.

RATHAIAH, Y. Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugarbeet. **Phytopathology**, v. 67, n. 3, p. 358-362, 1977.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

SILVA, M. G. D.; POZZA, E. A.; LIMA, C. V. R. V. D.; FERNANDES, T. J. Temperature and light intensity interaction on *Cercospora coffeicola* sporulation and conidia germination. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 2, p. 198–204, 2016.

SMITH, D. H.; PAUER, G. D. C.; SHOKES, F. M. *Cercosporidium* and *Cercospora* leaf spots of peanut. **Plant diseases of international importance**, v. 2, p. 285-304, 1992.

SOUZA, A. G. C.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 10, p. 540-546, 2012.

TAKEMOTO, D.; MIZUNO, Y. Belowground and Aboveground Strategies of Plant Resistance Against *Phytophthora* Species. In: **Belowground Defence Strategies in Plants**. Springer, Cham, 2016. p. 151-169.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.

TRESE, A.T.; LOSCHKE, D.C. High contrast resolution of mycelia of pathogenic fungi in corn tissue after staining with calcofluor and destaining with cellulose. **Phytopatology**, Lancaster, v. 80, n. 2, p. 196-200, Feb. 1990.

VALE, P. A. S.; DE RESENDE, M. L. V.; BOTELHO, D. M. dos S.; POZZA, E. A.; OGOSHI, C.; MONTEIRO, A. C. A.; COSTA, B. H. G.; VASCONCELOS, V. A. M. Temperature, incubation time and virulence of *Cercospora coffeicola* in the production of cercosporin. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 7–8, p. 371–379, 2019.

WATANABE, H. S. Comercialização de goiaba no mercado nacional. In: NATALE, W.; ROZANE, D.E.; SOUZA, H.A. de; AMORIN, D.A. de. (Ed.) **Cultura da Goiaba – do plantio à comercialização**. Vol1. Jaboticabal: FCAV, Capes, CNPq, FAPESP, Fundunesp, SBF, 2009.p. 133-150.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

YOU, B.-J.; LEE, M.-H.; CHUNG, K.-R.; YOU, B.; CHUNG, K. Production of cercosporin toxin by the phytopathogenic *Cercospora* fungi is affected by diverse environmental signals. **Can. J. Microbiol**, v. 54, p. 259–269, 2008.